

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kaisa Põhako

**Histidiinirikkad rakkudesse sisenevad peptiidid siRNA transpordiks**

Bakalaureusetöö (12EAP)

Juhendaja *PhD* Piret Arukuusk

TARTU 2017



## Infoleht

Minu bakalaureusetöö pealkiri on "Histidiinirikkad rakkudesse sisenevad peptiidid siRNA transpordiks". Geeniteraapia üheks suurimaks väljakutseks on leida efektiivne ning ohutu transportmehhanism nukleiinhappemolekulide ja muude terapeutiliste ühendite viimiseks rakkudesse. Üheks edukaks kandidaadiks võivad olla rakku sisenevad peptiidid (RSP), mis suudavad rakku transportida nende külge seotud lastmolekule bioloogilise efekti saavutamise eesmärgil.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada RSP NickFect55 (NF55) histidiine sisaldavate pH-tundlike analoogide H4-C18, H6-C20, H6<sup>1</sup>-C18 ja H8-C20 hulgast parim, mida kasutada kaheaahelalise lühikese interferentsi-RNA (siRNA) raku tsütoplasmasse transportimiseks geenivaigistamise eesmärgiga. Käesolevas töös on leitud, et antud RSP-dest on optimaalseim H6-C20, mis moodustab siRNA-ga hepariinisoolade ja proteinaas K juuresolekul stabiilse kompleksi. Samuti saavutab siRNA/H6-C20 kompleks soovitud bioloogilise efekti transfektsioonil U87-luc2 või CHO-GFP rakkudesse ega oma *in vitro* katsetes kasutatud kontsentratsioonidel rakkude elumusele negatiivset mõju.

**Märksõnad:** rakku sisenev peptiid, NickFect55, siRNA, histidiin, RNA interferents

**CERCS kood:** B220 Geneetika, tsütogeneetika

The title of my Bachelor's thesis is "Histidine-rich cell-penetrating peptides for siRNA delivery". One of the biggest challenge in gene therapy is to find an effective and safe transporter for nucleic acids and other therapeutic compounds delivery into the cells. One successful candidate may be cell-penetrating peptides (CPP) that are capable to penetrate into cells and transport cargo molecules attached in order to achieve desired therapeutic effect.

The aim of this thesis was to find out which CPP NF55 pH-responsive analogue with histidine residues - H4-C18, H6-C20, H6<sup>1</sup>-C18 and H8-C20 - suits the best for small interfering RNA (siRNA) delivery into the cells. In this thesis was stated that most effective candidate for siRNA delivery was CPP H6-C20, which forms most optimal complex in the presence of heparin salts and enzyme proteinase K. H6-C20 also achieves desired biological effect of transfection into U87-luc2 and CHO-GFP cell lines and does not have any toxic effect on the survival of the cells.

**Keywords:** cell-penetrating peptide, NickFect55, siRNA, histidine, RNA interference

**CERCS code:** B220 Genetics, cytogenetics

# Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid .....	5
Sissejuhatus .....	7
1. Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1 Nukleiinhapetel põhinevad terapeutilised molekulid – RNAi ja siRNA .....	8
1.1.1 Terapeutiliste ühendite transport rakkudesse .....	10
1.2 Rakkudesse sisenevad peptiidid.....	11
1.2.1 RSP-de ja lastmolekulide vahelise kompleksi moodustumine .....	13
1.2.2 Katioonsete RSP-de modifitseerimine.....	14
1.2.3 Transportaan, PepFect, NickFect.....	15
2. Eksperimentaalne osa.....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja meetodika .....	18
2.2.1 Töös kasutatud peptiidid.....	18
2.2.2 Histidiinirikaste RSP-de keskkonna pH säilitamisvõime hindamine .....	18
2.2.3 siRNA/RSP komplekside moodustamine .....	19
2.2.4 Kasutatud rakuliinid ja nende kultiveerimine.....	19
2.2.5 Rakukultuuris bioloogilise efekti hindamine luminesentsi baasil .....	20
2.2.6 siRNA/RSP kompleksi stabiilsus hepariini soola suhtes.....	20
2.2.7 siRNA/RSP kompleksi stabiilsus ensüümi proteinaas K suhtes .....	21
2.2.8 Läbivoolutsütomeetriaga transfecteeritud rakupopulatsiooni määramine .....	21
2.2.9 Konfokaalmirkoskoopiaga bioloogilise efekti visualiseerimine .....	22
2.2.10 Rakkude elumuse määramine .....	22
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Keskkonna pH säilitamise võime sõltub histidiinide arvust RSP-s.....	24

2.3.2	Histidiinide lisamine RSP-le suurendab siRNA/RSP kompleksi stabiilsust .....	25
2.3.3	Edukamad transportvektorid on 4 ja 6 histidiiniga RSP-d .....	28
2.3.4	Histidiinirikkad RSP-d ei mõjuta oluliselt rakkude elumust .....	33
	Kokkuvõte .....	37
	Summary .....	38
	Kasutatud kirjandus .....	39
	Lisad .....	43
	Lihtlitsents .....	44
	Tänuavaldused .....	45

## Kasutatud lühendid

C18	stearoüül - steariinhappejääk, milles on 18 süsinikku (küllastunud rasv-hape)
C20	arahoüül - arahiinhappejääk, milles on 20 süsinikku (küllastunud rasv-hape)
CHO-GFP	<i>chinese hamster ovary cells</i> , Hiina hamstri munasarja rakuliin, mis stabiilselt ekspresseerib GFP valku
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> , rakku sisenev peptiid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (sööde rakkude kasvatamiseks)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , fluorestsents aktiveeritud rakusorter ehk läbivoolutsütomeetria
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , veise loote seerum
Fmoc	9-fluoroenüülmetüülloksükarbonüül rühm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , roheliselt fluorestseeruv valk
miRNA	mikroRNA
MQ	<i>Milli-Q water</i> , deioniseeritud vesi
MR	<i>molar ratio</i> , molaarsuhe
mRNA	<i>messenger RNA</i> , informatsiooni-RNA
MTS	tetrasooliumsool
NF	NickFect perekonda kuuluv rakku sisenev peptiid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverdatud soolalahus
PF	PepFect perekonda kuuluv rakku sisenev peptiid
QN	trifluorometüülkinooliin, endosomolüütiline klorokviinianaloogi jääk
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , RNA indutseeritud geenivaigistamise kompleks

RLU	<i>relative luminescence unit</i> , suhteline luminesentsi ühik
RNAi	RNA interferents
RSP	rakku sisenev peptiid
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> , juuksenõela struktuuriga RNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , kaheahelaline lühike interferentsi-RNA
TFA	trifluoroatseethape
TP10	rakku sisenev peptiid Transportaan10
U87-luc2	glioblastoomi rakuliin, mis ekspresseerib ensüümi lutsiferaas
UT	<i>untreated</i> , töötlemata kontrollrakud

## Sissejuhatus

Paljude geneetiliste haigusseisundite raviks on võimalik kasutada erinevaid bioaktiivseid ühendeid nagu näiteks valgud, peptiidid või nukleinhappemolekulid. Terapeutilise efekti saavutamiseks tuleb bioaktiivsed ühendid kõigepealt transportida raku tsütoplasmasse või konkreetse sihtmärkorganellini. Enamus potentsiaalset raviefekti omavad molekulid pole näiteks oma suure molekulmassi või laengu tõttu võimelised iseseisvalt raku plasmamembraani läbima. Seetõttu on aina enam hakatud tähelepanu pöörama erinevatele viiruslikele ja mitteviiruslikele transportmolekulidele, mis võimaldaks neid rakkudesse viia.

Viirusvektorid suudavad väga efektiivselt siseneda rakkudesse ning luua seal soovitud terapeutilise efekti. Siiski on sellistel transportvektoritel ka palju puuduseid nagu näiteks tootmise keerukus ning potentsiaalsed soovimatud immuunreaktsioonid sihtmärkrakus (Hardee *et al.*, 2017; Al-Dosari ja Gao, 2009).

Viiruslike transportvektorite puuduste vältimiseks on loodud mitmeid mitteviiruslikke transportvektoreid, nende hulgas rakkudesse sisenevad peptiidid (RSP), mis suudavad siseneda rakkudesse nii *in vitro* kui ka *in vivo*. RSP-deks nimetatakse peptiide, mis koosnevad tavaliselt 4-40-st aminohappejäägist ning on katioonsete ja/või amfipaatsete omadustega. Nende külge saab siduda lastmolekuli alates väikestest madalmolekulaarsetest molekulides lõpetades suurte valkudeni (Langel, 2015).

Parandamaks RSP-de omadusi on nende järjestuses tehtud mitmeid erinevaid modifikatsioone. Näiteks hüdrofoobsuse suurendamiseks ning paremaks endosoomidest vabanemiseks, et saavutada efektiivsem bioloogiline efekt, on lisatud RSP-dele rasvhappejääke. (Mäe *et al.*, 2009; Lehto *et al.*, 2011). pH-tundlikuse suurendamiseks on RSP-dele lisatud histidiini (Moulay *et al.*, 2016), mis on tänu kõrvalahela imidasoolringi pKa-le (6) eriti tundlikud just madala pH suhtes (Kato *et al.*, 2013) ning samuti soodustavad endosoomidest vabanemist (Lo ja Wang, 2008).

Antud töö eesmärgiks oli leida RSP NickFect55 (NF55) histidiinidega pH-tundlike analoogide H4-C18, H6-C20, H6<sup>1</sup>-C18 ja H8-C20 hulgast parim, mis transpordiks edukalt kaheaahelalist lühikest interferentsi-RNA-d (siRNA) läbi raku plasmamembraani tsütoplasmasse ning RNA interferentsiga saavutaks soovitud bioloogilise efekti, milleks oli sihtmärkgeeni maha reguleerimine. Töö koostamiseks läbi viidud katsed teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.



## 1. Kirjanduse ülevaade

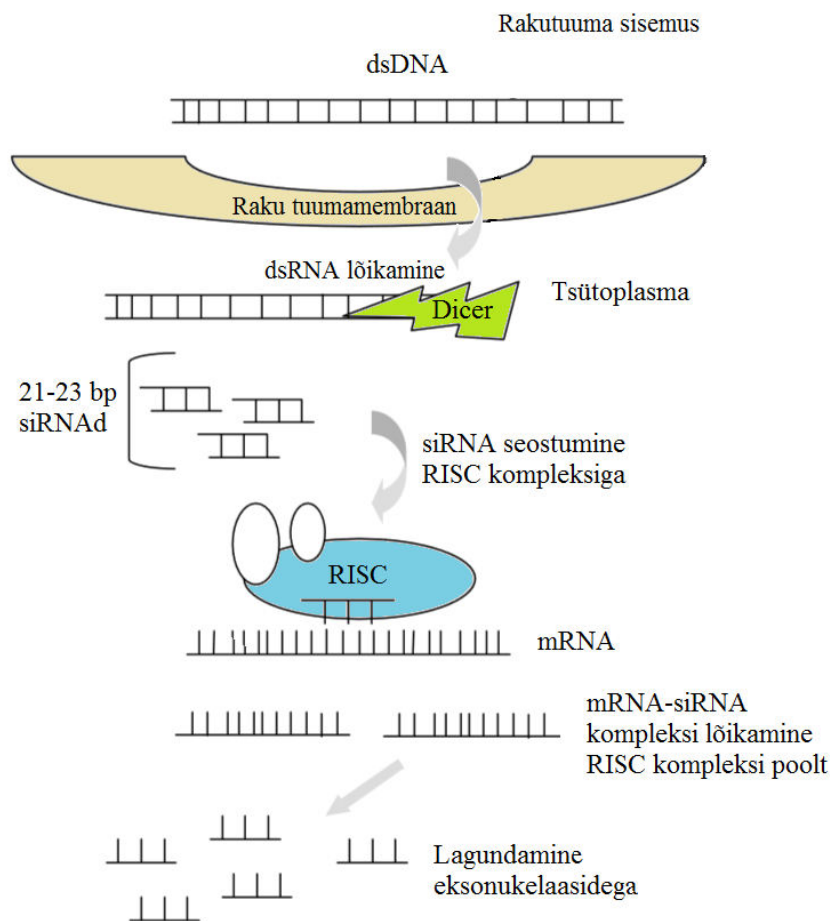
Erinevate haiguste raviks ja haigusseisundite leevendamiseks on teoreetiliselt võimalik kasutada väga erinevaid molekule, alates madalmolekulaarsetest ühenditest kuni suurte nukleiinhappemolekulide nagu plasmiid või isegi valkudeni (Koren ja Torchilin, 2012). Uute molekulide kasutamist terapeutilistel eesmärkidel piiravad sageli nende puudulik võime siseneda rakku, vähene sihtmärkspetsiifilisus ning ebastabiilsus *in vivo*. Need puudused võivad viia bioaktiivsete ühendite terapeutiliste omaduste languseni. Seetõttu on soovitud efektide saavutamiseks vaja kasutada suuremaid doose, mis omakorda võivad viia kahjulike kõrvaltoimeteneni (Heitz *et al.*, 2009). Enne uue molekuli rakendamist terapeutilistel eesmärkidel tuleb testida tema füüsikalisi-keemilisi omadusi (lahustuvus, formulatsioon, stabiilsus), toksilisust, biosaadavust ja võimalikku manustamisviisi, mistõttu välistatakse juba algfaasis paljud terapeutilise potentsiaaliga molekulid, kuigi sobiva transpordimeetodi olemasolu muudaks nende rakendamise võimalikuks (Ross ja Wilson 2014).

### 1.1 Nukleiinhapetel põhinevad terapeutilised molekulid – RNAi ja siRNA

Üheks levinumaks terapeutilise ja biotehnoloogilise väljundiga molekulide klassiks on nukleiinhappemolekulid. Neid saaks kasutada geeniteraapias, et parandada, vahetada või reguleerida geene ning seeläbi vältida või ravida haiguslikku seisundit (Hardee *et al.*, 2017). Lisaks on rakkudesse võimalik viia ka terveid geene ning antud konstruktilt soovitud produkti ekspresseerida. Nukleiinhapetel põhinevate molekulide peamiseks puudusteks on nende vähene jõudmine soovitud rakku ja rakusiseste sihtmärkideni, kiire lagunemine nii rakuvälises keskkonnas kui ka raku sees ning suur laengutihedus, mis takistab rakumembraani läbimist. (Prasad ja Roy, 2008)

RNA baasil arendatud terapeutilistel meetoditel on suur potentsiaal leevendada siiani ravimatute geeniproductide poolt põhjustatud haigusseisundeid alates vähist lõpetades Alzheimeri tõvega (Prasad ja Roy, 2008). RNA interferents (RNAi) on bioloogiline protsess, mille käigus toimub transkriptsioonijärgne geeni vaigistamine (Joonis 1). Selles protsessis osalevad lühikesed siRNA-d, mikroRNA-d (miRNA) või lühikesed juuksenõela struktuuriga RNA-d (shRNA), mis võivad olla nii ekso- kui ka endogeenset päritolu. siRNA-d on lühikesed umbes 21-25 nukleotiidi pikkused molekulid, mis saadakse pikast kaheaahelalisest RNA-st (dsRNA), mida lõikab Dicer ensüüm. Saadud siRNA molekul liitub RNA indutseeritud vaigistava kompleksiga (*RNA-induced silencing complex*, RISC), kus kaheaahelaline siRNA molekul harutatakse lahti ja üks ahelatest läheb lagundamisele. Teise ahela abil toimub komplementaarne seondumine informatsiooni-RNA-le (mRNA), mis

kannab valgusünteesiks vajalikku informatsiooni üle DNA-lt rakuorganeli ribosoom, kus toimub valgusüntees. Agronaut - valk, mis seostub siRNAGA - teeb lõike komplementaarses seondumiskohas ning lõigatud mRNA lagundatakse või takistatakse translatsioon selliselt mRNA-lt, vaigistades nii geeni ekspressiooni (Wilson ja Doudna, 2013).



**Joonis 1.** RNA interferentsi mehhanism (Prasad ja Roy, 2008).

siRNA transport rakkudesse on paljulubav võimalus, mille abil transkriptsioonjärgselt vaigistada üleekspresseeritud või defektsete geenide avaldumist. Nii saab leevendada erineva põhjusega haigusseisundeid, nagu näiteks viirusinfektsioonid, pärilikud haigused ja isegi vähkkasvajad. Saavutamaks soovitud efekti peab transportimiseks kasutatav mehhanism viima siRNA raku tsütoplasmasse ning kaitsma seda nukleaside eest (Cerrato *et al.*, 2014). siRNA transpordil rakku esineb aga probleeme nagu näiteks vähene vabanemine transportija küljest. (Hardee *et al.*, 2017). Nii on hakatud järjest enam tähelepanu pöörama erinevatele sobilikele transportmolekulidele.

### 1.1.1 Terapeutiliste ühendite transport rakkudesse

Suurendamaks bioloogiliselt aktiivsete molekulide, mis mõjutavad rakke ja organisme väikestes ainekogustes, kasutamisalasid näiteks biotehnoloogias või meditsiinis on arendatud mitmeid transportsüsteeme ning manustamisi (Ross ja Wilson, 2014). Need aitavad vähendada terapeutiliste ühendite kõrvaltoimeid läbi sihtmärkspetsiifilisuse suurendamise, nukleinhappemolekuli rakku jõudmise soodustamise ja lagunemise vähendamise. Lisaks peab transportsüsteem ise olema rakkudele ohutu (Gao *et al.*, 2007).

Nukleinhapetel põhinevate molekulide viimiseks rakku on loodud erinevaid viirusvektoreid ja mitteviirusvektoritel põhinevaid transportsüsteeme. Kõige enam kasutatakse viirusvektoreid, sest nad on kõrge rakku sisenemise efektiivsusega, suudavad sealjuures rakku transportida erinevat geneetilist materjali ning tagavad pikaajalise geeniekspressiooni rakus (Hardee *et al.*, 2017). Ometi on viirusvektoritel ka palju puudujääke. Esiteks on nende tootmine keeruline ja ajakulukas. Teiseks võivad korduval manustamisel tekkida ägedad põletikulised immuunreaktsioonid. Kolmandaks võib osade viirusvektorite puhul probleemiks osutuda insertiooniline mutagenees sihtmärkrakkudes (Al-Dosari ja Gao, 2009). Kuigi viirusvektorid on põhilised transporterid geeniteraapias, otsitakse neile efektiivsemaid ning ohutumaid alternatiive (Finer ja Glorioso, 2017)

Mitteviiruslikul transpordil, mis on sünteetilistel vektoritel põhinev geeniteraapia, kasutatakse füüsikalisi või keemilisi meetodeid nukleinhapete rakku transportimiseks (Gao *et al.*, 2007). Mitteviiruslikud meetodid on küll praeguseni vähemefektiivsed kui viirustel põhinevad meetodid, kuid nendega seotud väiksem immuunsüsteemi aktivatsioon teevad neist tõsiseltvõetava alternatiivi. Samuti on mitteviiruslikud transporterid kättesaadavamad, neid on lihtsam ja odavam toota, modifitseerida ning kasutada (Hardee *et al.*, 2017). Füüsikaliste meetodite korral kasutatakse näiteks mehhaanilisi, elektrilisi, hüdrodünaamilisi või laserikiirgusel põhinevaid meetodeid, et tekitada rakumembraani ava või destabiliseerida membraani nukleinhappe rakku sisenemiseks. Füüsikaliste meetodite piiranguks kasutamisel on just nende tulemusena tekkivad rakumembraani vigastused (Gupta *et al.*, 2005) ning *in vivo* kasutus nõuaks täpset meetodi optimeerimist. Füüsikalistest meetoditest on kõige efektiivsemalt *in vivo* kasutatud hüdrodünaamilist süsti, kuid seda siiani vaid väikestel närilistel (Nayerossadat *et al.*, 2012)

Mitteviiruslikest meetoditest on viimastel aastatel kõige rohkem arendatud katioonseid lipiide või polümeere, mis moodustavad rakku transporditava ühendiga kompleksi (Gao *et al.*, 2007). Komplekside moodustamisel saab kasutada kandja ja nukleinhappemolekuli

kovalentsed või mittekovalentsed kompleksimoodustamise strateegiat (Eguchi ja Dowdy, 2009). Need nukleiinhape/kandja kompleksid sisenevad sihtmärkrakku endotsütoosi või fagotsütoosi teel. Endotsütoos ja fagotsütoos on rakkude üks võimalus väliskeskkonnast makromolekulide omastamiseks. Rakku sisenemisel moodustub kompleksi ümber raku plasmamembraanist lipiidse kaksikkihiga organell – vesiikul ehk endosoom, millest peab kompleks vabanema, et jõuda sihtmärkorganellini. Endosoomidesse kinnijäämisel transporditakse kompleks kas rakust välja või muutub endosoom lüsoosoomidiks, kus toimub kompleksi lüüsimine ehk lagundamine (Pae ja Pooga, 2014).

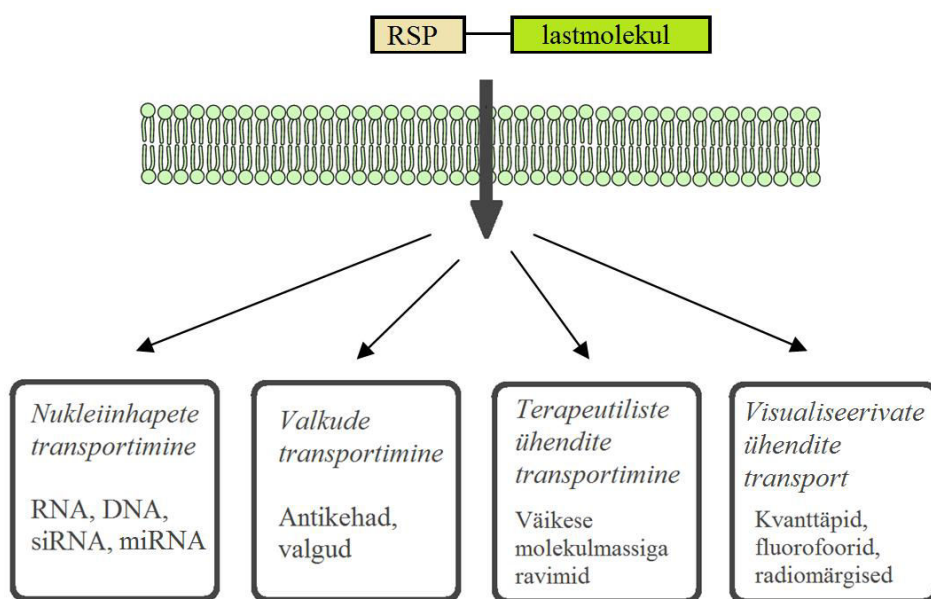
Üheks keemiliste mitteviiruslike vektorite hulka kuuluvaks ja efektiivseks transportvektoriks on rakkudesse sisenevad peptiidid (RSP) (Brasseur ja Divita, 2010). RSP-de eelisteks on nende nende lihtne keemiline süntees ja peptiidse järjestuse modifitseerimise võimalus. Lisaks sellele on näidatud, et RSP-s suudavad edukalt siseneda erinevatesse rakuliinidesse, jõuavad rakus sihtmärkorganelli, neil on madal toksilisus ning töötavad efektiivselt ka madalatel doosidel (Heitz *et al.*, 2009).

## 1.2 Rakkudesse sisenevad peptiidid

1988. aastal kirjeldasid kaks eraldiseisvat uurimisgruppi HI-viiruse transkriptsiooni transaktiveeriva valgu Tat võimet läbida rakumembraani ning siseneda rakku. (Frankel ja Pabo, 1988; Green ja Loewenstein, 1988). Kolm aastat hiljem leiti rakkudesse sisenev 60-st aminohappejäägist koosnev äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) Antennapedia homeodomeen (Joliot *et al.*, 1991). Sellest eraldati aastal 1994. esimene RSP, milleks oli 16-st aminohappejäägistst koosnev pAntennapedia (pAntp), mis hiljem nimetati penetratiiniks. (Derossi *et al.*, 1994). Samal aastal näidati ka, et Tat valguga on võimalik siduda erinevaid makromolekule ja neid seejärel viia imetajate kudedesse ning organitesse (Fawell *et al.*, 1994).

Rakkudesse sisenevateks peptiidideks nimetatakse peptiide, mis koosnevad tavaliselt 4-40-st aminohappejäägist ja mis suudavad nii *in vitro* kui ka *in vivo* siseneda rakku ja transportida sinna kovalentselt või mittekovalentselt seotud bioaktiivseid lastmolekule (Langel, 2015). Lastmolekulideks nimetatakse rakkudesse transportvektoritega, antud kontekstis RSP-dega, transporditavaid molekule, milleks võivad olla väikesed keemilised ühendid aga ka suuremassilised molekulid. Näiteks on RSP-dega rakku viidud *antisense* oligonukleotiidide, plasmiidset DNA-d ja siRNA-t (Joonis 2) (Cerrato *et al.*, 2014). Samuti on võimalik RSP-dega viia rakkudesse valke, mis muidu rakumembraani ei läbi ning transporditud valkude abil reguleerida geeniekspresiooni. Näiteks Tat valgu fragmendid on

võimelised transportima rakkudesse  $\beta$ -galaktosidaasi, mis on molekulaarbioloogias kasutatud markerensüümina. Lisaks neile on RSP-sid kasutatud ka visualiseerivate ühendite, nagu näiteks fluorofooride ja radiomärgiste, ning biosensorite transportimiseks rakkudesse. Näiteks on RSP abil transporditud läbi vere-aju barjääri (*blood-brain barrier*) kvanttäppe, samuti on kasutatud RSP-sid rakusisese tsingikoguse määramiseks ning viirusliku infektsiooni leviku jälgimiseks reaalajas (Fonseca *et al.*, 2009).



**Joonis 2.** RSP-dega transporditavad ühendid (Stewart *et al.*, 2008).

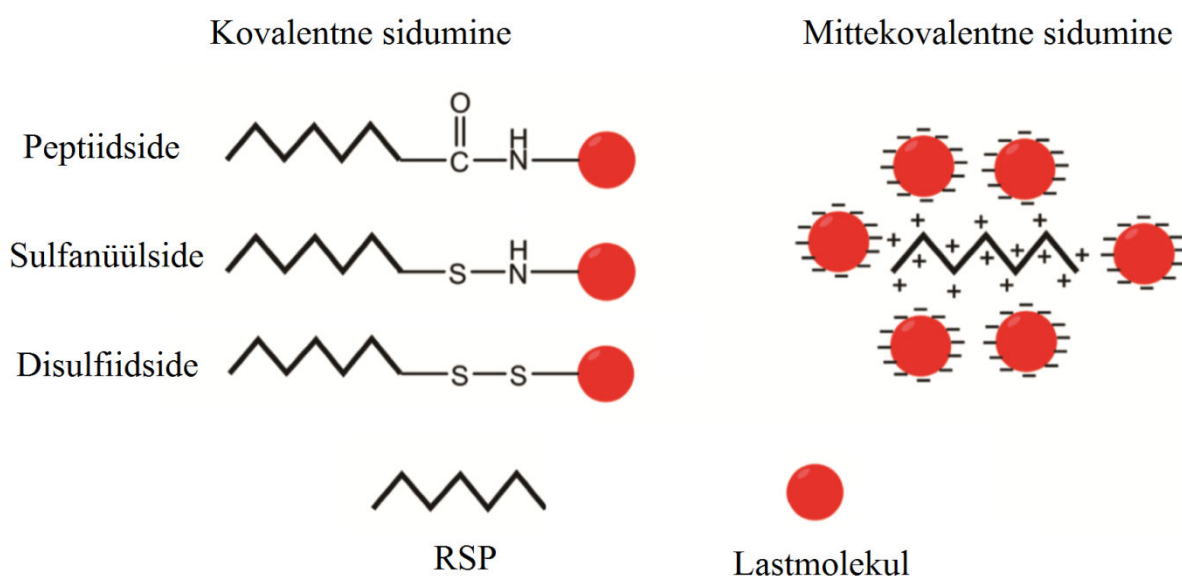
RSP-d saab klassifitseerida mitmel viisil. Esimene võimalus on seda teha päritolu alusel, kus RSP-d jaotatakse looduslikest valkudest saaduteks, kimäärseteks, mis koosnevad nii looduses leiduvatest kui ka sünteetilisest järjestustest ning sünteetilisteks peptiidideks, mis on tehislikult loodud järjestustega. Lisaks sellele võib RSP-d jagada katioonseteks, hüdrofoobseteks ja amfipaatsseteks. Katioonsetel RSP-del on järjestuses aminohapped, mis füsioloogilisel pH-l (7,2-7,4) omavad positiivset laengut. Nendeks aminohapeteks on lüsiin, arginiin ning histidiin. Lisaks sellele on peptiidi järjestusse võimalik keemilisel sünteesil lisada ka mitteprotegeenseid aminohappeid, mida looduslikes valkudes ei kodeerita ning mille kõrvalahela rühm omab samuti positiivset laengut - näiteks ornitiin. Hüdrofoobsed peptiidid koosnevad kas ainult mittepolaarsetest aminohapetest või sisaldavad vähesel määral laenguga aminohappeid. Amfipaatsed RSP-d koosnevad kahest erinevast regioonist - positiivselt laetud ja/või hüdrofiilsest osast ning hüdrofoobsest osast. Need peptiidid saab omakorda jagada veel primaarseteks ja sekundaarseteks amfipaatsseteks. (Langel, 2015)

### 1.2.1 RSP-de ja lastmolekulide vahelise kompleksi moodustumine

On kaks peamist võimalust, kuidas siduda transporditav lastmolekul RSP külge - kovalentselt või mittekovalentselt (Cerrato *et al.*, 2014).

Kovalentsel sidumisel sünteesitakse side keemiliselt transporditava molekuli ja RSP vahele. Peamiselt kasutatakse peptiid-, disulfiid-, sulfanüül-, või malemiidsidet (Joonis 3.) (Koren ja Torchilin, 2012). Üks eeliseid, mis kovalentse sidumisega saavutatakse on suurem kompleksi stabiilsus ning ühekordse lastmolekuli ja RSP vahelise kompleksi moodustumine, mis on oluline *in vivo* katsetes (Cerrato *et al.*, 2014). Meetodi puuduseks on, et konjugatsiooni käigus võib muutuda lastmolekuli bioaktiivsus ning selline sidumine on ajakulukam ning nõuab keerulist sünteesiprotsessi. (Heitz *et al.*, 2009).

Nukleiinhapped omavad nendes leiduva fosfaatselgroo tõttu negatiivset üldlaengut. Tänu sellele on nukleiinhapped võimelised interakteeruma RSP-dega, mis sisaldavad positiivse laenguga aminohappejääke. Kui RSP-d omavad lisaks ka hüdrofoobset regioonit, on komplekside moodustumine veelgi enam soodustatud (Crooke *et al.*, 2016). RSP-de ja nukleiinhapete mittekovalentselt seotud komplekside moodustumisel on peamisteks elektrostaatiliselt ja hüdrofoobset interaktsioonid ning van der Waalsi jõud (Cerrato *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2013). Mittekovalentse seondumise meetodi puhul piisab RSP ja lastmolekuli omavahelisest segamisest, et moodustuks kompleks. Eeliseks on, et pole vaja teostada sünteesiprotsessi, säilib lastmolekuli bioloogiline aktiivsus ning ühe RSP-ga saab siduda mitu erinevat lastmolekuli (Koren ja Torchilin, 2012).



**Joonis 3.** Kovalentne ja mittekovalentne sidumine (Cerrato *et al.*, 2014).

Oluline on saavutada optimaalne stabiilsus, mille juures lastmolekul oleks RSP-ga piisavalt tugevalt seotud, et ületada raskusteta bioloogilisi barjääre, kuid samal ajal vabaneks õigel hetkel peptiidi küljest. Selle jaoks ei tohi olla side RSP ja lastmolekuli vahel ei liiga tugev ega liiga nõrk. On oluline, et transporditav lastmolekul ei vabaneks RSP küljest enne raku plasmamembraani läbimist, vaid eemalduks soovitud terapeutilise efekti saavutamiseks alles sihtmärkrakus. (Viola *et al.*, 2010)

### 1.2.2 Katioonsete RSP-de modifitseerimine

Kuna RSP-de ja nukleiinhapete kompleksid sisenevad rakkudesse peamiselt endotsütoosiga, on nende üheks põhiliseks limiteerivaks põhjuseks kõrgema bioaktiivsuse saavutamisel endosoomidesse pidama jäämine ja sellele järgnev lagundamine. Selle leevendamiseks on kasutatud mitmeid strateegiaid. On näidatud, et rasvhappejäägi lisamine peptiid järjestusele tõstab RSP hüdrofoobsust ning saavutatud bioaktiivsust lastmolekulilt (Mäe *et al.*, 2009). Rasvhappejäägi lisamisel on oluline ka lisatava rasvhappejäägi pikkus (Lehto *et al.*, 2017) ning küllastatus (Swiecicki *et al.*, 2015). RSP PepFect14 puhul on näidatud, et stearoüülhappejäägi lisamine N-terminaalsesse otsa parandab oluliselt peptiidi vabanemist endosoomidest (Lehto *et al.*, 2011).

RSP küljest vabanenud lastmolekul pääseb tsütoplasmasse tõenäoliselt kas endosoomi lõhkemise kaudu tänu osmootsele paisumisele (Lo ja Wang, 2008) või väiksemate membraani tekkivate aukude ja membraani destabiliseerumise tõttu (Melikov ja Chernomordik, 2005; Kichler *et al.*, 2006). RSP PepFect6 korral on peptiidi järjestusele lisatud endosomolüütiline osa, näiteks klorokviinialoogi jääk, mis soodustab endosoomidest vabanemist. (Andaloussi *et al.*, 2011).

Vabanemist võivad soodustada ka peptiidi järjestusse lisatud histidiini või tsüsteiini aminohappejäägid (Lo ja Wang 2008). Histidiinide lisamist on laialdaselt kasutatud peptiidide antimikroobse toime tõstmiseks (Kacprzyk *et al.*, 2007) ning pH-tundlikkuse suurendamiseks (Moulay *et al.*, 2016). Histidiin on valkudes leiduv aminohape, mille kõrvalahelas on imidasoolitsükel, mille pKa on 6 (Lo ja Wang, 2008). See on madalam kui lüsiini (10,53) või arginiini (12,48) kõrvalahela pKa. Seetõttu on histidiin füsioloogilisel pH-l (7,2-7,4) vähem protoneeritud ning histidiine sisaldava peptiidi kogulaeng madalam, kui sama pikal lüsiine või arginiine sisaldaval peptiidil (Moulay *et al.*, 2016). See erinev kõrvalrühma pKa teeb histidiine sisaldava peptiidi tundlikumaks just endosoomides või kasvaja ümbruses leiduva madalama pH suhtes (Kato *et al.*, 2013).

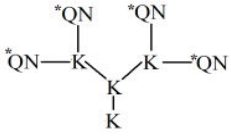
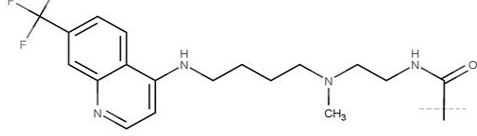
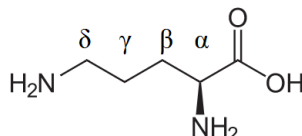
### 1.2.3 Transportaan, PepFect, NickFect

Transportaan on kimäärne RSP, mis koosneb 27-st aminohappejäägist ning loodi Ülo Langel'i grupi poolt 1998. aastal. Selle N-terminaalses osas on neuropeptiidist galaniin pärit 12-st aminohappejäägist koosnev järjestus. C-terminaalses osas paikneb 14-st aminohappejäägist koosnev järjestus, mis on peptiidne vapsiku toksiin mastorpaan. Neid kahte järjestust ühendab lüsiin (Pooga *et al.*, 1998). Kaks aastat hiljem loodi RSP Transportaan10 (TP10), mis on Transportaani analoog, millelt on eemaldatud N-terminaalsest otsast esimesed 6 aminohapet. (Soomets *et al.*, 2000) TP10 N-terminaalsesse otsa stearüülhappejäägi lisamisel saadi RSP PepFect3 (PF3) (Mäe *et al.*, 2009), mis transportis edukalt plasmiidset DNAd rakkudesse ja näitas suuremat lutsiferaasi ekspressiooni. On arvatud et, PF3 efektiivsus on tingitud stabiilsemast kompleksist transporditava molekuliga ning võimest edukalt vabaneda endosoomist. (Lehto *et al.*, 2012) Trifluorometüülkinooliini kovalentsel sidumisel PF3-ga saadi PepFect6 (PF6), millel on võime edukalt vabaneda endosoomidest nende hapestumise tagajärjel. PF6 on kasutatud siRNA transporterina isegi raskesti transfekteeeritavates rakuliinides ning omab vähest tsütotoksilisust (Andaloussi *et al.*, 2011)

PF3 põhjal on arendatud välja RSP-de rühm NickFectid (NF). PF3 baasil loodi NickFect51 (NF51), milles galaniini ja mastorpaani osa ühendav lüsiin on asendatud mitteproteogeense aminohappe ornitiiniga. 6. positsiooni glütsiin liideti ornitiini kõrvalahela aminorühmaga ( $\delta$ -positsiooni aminorühm, tüüpiliselt liidetakse aminohape  $\alpha$ -positsioonis olevale aminorühmale), et parandada transfektsiooni efektiivsust ning stabiliseerida kompleksi. NF51 on võimeline edukalt transportima rakku plasmiidset DNA-d ning siRNA-t väga erinevate rakuliinide puhul, samuti ületas see reagenti Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 transfektsiooni efektiivsuse taseme ega omanud olulisi tsütotoksilisi kõrvaltoimeid (Arukuusk *et al.*, 2013). NF51 baasil arendati välja NF55, kus 19. positsioonis asuv lüsiin on asendatudalaniiniga. Nii moodustub NF55 sekundaarses amfipaatses struktuuris selge hüdrofiilne regioon. Võrreldes NF51-ga transportis NF55 plasmiidset DNA-d rakku 2 korda paremini, samuti olid NF55-ga moodustatud kompleksid tunduvalt stabiilsemad ning *in vivo* katsetes sisenesid kompleksid edukalt ka tuumorisse (Freimann *et al.*, 2016). Seega on NickFectide perekonna peptiidid väga paljulubavad rakendusteks geeniteraapia vallas.



**Tabel 1.** Näited RSP-dest ning nende järjestused. (Pae ja Pooga, 2014; Regberg *et al.*, 2015; Freimann *et al.*, 2016) O<sup>b</sup> - Ornitiinile järgnev aminohape on lisatud α-aminorühma asemel ornitiini δ-aminorühma kaudu.

Peptiid	Järjestus
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
PepFect3	Stearoüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
PepFect6	Stearoüül-AGYLLGK <sup>a</sup> INLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
NickFect51	Stearoüül-AGYLLGO <sup>b</sup> INLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>
NickFect55	Stearoüül-AGYLLGO <sup>b</sup> INLKALAALAKAIL-NH <sub>2</sub>
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>K<sup>a</sup></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>*QN</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>O<sup>b</sup></p>  </div> </div>	

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesolevas bakalaureusetöös on kasutatud eelnevalt disainitud ja sünteesitud RSP järjestustest iga seeria parimaid. Histidiine on lisatud peptiidahelatesse selle jaoks, et muuta peptiidahelad positiivselt laetuks ja pH-tundlikuks madala pH suhtes. Happelises keskkonnas on peptiidahelas olevad histidiinijäägid protoneeritud ning RSP omab seega suuremat üldlaengut. Sellised RSP-d peaksid paremini interakteeruma negatiivselt laetud nukleiinhapetega, antud töö kontekstis siRNA-ga, ning efektiivsemalt sisenema rakku ning saavutama seal soovitud bioloogilise efekti. Samuti peaksid sellised peptiidid pH muutudes suutma säilitada keskkonna pH-d ja nii suutma kaitsda end happelises keskkonnas aktiveeruvate katalüütiliste ensüümide eest ning edukamalt vabanema emdosoomidest. Käesoleva bakalaureusetöö hüpotees on, et histidiinide arv peptiidahelas mõjutab RSP-de omadusi nagu keskkonna pH säilitamise võime, lastmolekuliga moodustatud komplekside stabiilsus ning rakkudesse sisenemise ja soovitud bioloogilise efekti saavutamise efektiivsus. Antud töö eesmärgiks oli leida RSP NF55 histidiinidega analoogide H4-C18, H6-C20, H6<sup>1</sup>-C20 ja H8-C20 seast siRNA transpordi jaoks efektiivseim. Selle jaoks:

1. Määrati tiitrimisel põhineva katse abil RSP-de puhverdusvõime, mille alusel saab võrrelda peptiidide võimet säilitada keskkonna pH.
2. Võrreldi histidiinirikaste RSP-de ja siRNA vahel moodustunud komplekside stabiilsust hepariinsoolade ning ensüümi proteinaas K juuresolekul ning stabiilsuse sõltuvust histidiinide arvust peptiidahelas.
3. Hinnati töös kasutatud RSP-de efektiivsust transportvektoriga. Selle jaoks transfekteritakse kahte erinevat rakuliini - U87-luc2 ja CHO-GFP - siRNA/RSP mittekovalentselt moodustatud kompleksidega ning määratakse transfektsiooni ja soovitud bioloogilise efekti saavutamise efektiivsus luminesentsil põhineva meetodi abi ning läbivoolutsütomeetriaga. Transfekteritud rakke vaadeldaks konfokaalmikroskoopiga.
4. Võrreldakse töös kasutatud histidiinirikaste RSP-de mõju rakkude elumusele nii puhtal kujul peptiidilahusega kui ka siRNA/RSP kompleksidega.

## 2.2 Materjalid ja meetoodika

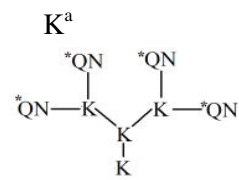
### 2.2.1 Töös kasutatud peptiidid

Töös kasutatud peptiidid (tabel 2) disainiti ja sünteesiti Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia labori poolt. Peptiidid sünteesiti automatiseeritud peptiidisüntesaatoril (Applied Biosystems, USA), kasutades fluorenüülmetüüloksükarbonüül (Fmoc) tahke faasi sünteesistrateegiat.

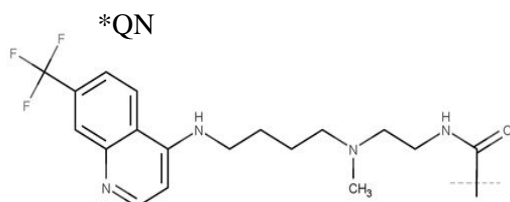
**Tabel 2.** Töös kasutatud RSP-d ja nende järjestused. O<sup>b</sup> - ornitiinile järgnev aminohape on lisatud α-aminorühma asemel ornitiini δ-aminorühma kaudu. Nominaallaengud on teoreetilised ning arvutatud programmiga MarwinSketch.

Peptiid	Järjestus	Rasv-hape	Nomi-naal-laeng (pH 6)	Nomi-naal-laeng (pH 7,4)
PF6	Stearoüül-AGYLLGK <sup>a</sup> INLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>	C18	+11	+8
NF55	Stearoüül-AGYLLGO <sup>b</sup> INLKALAALAKAIL-NH <sub>2</sub>	C18	+4	+3
H4-C18	Stearoüül-HHHYHHGO <sup>b</sup> ILLKALKALAKAIL-NH <sub>2</sub>	C18	+8	+5
H6-C20	Araoüül-HHHHHYHHGO <sup>b</sup> ILLKALKALAKAIL-NH <sub>2</sub>	C20	+9	+5
H6 <sup>1</sup> -C18	Stearoüül-HHHHHHHGO <sup>b</sup> ILLKALKALAKAIL-NH <sub>2</sub>	C18	+9	+5
H8-C20	Arahoüül-HHHHHHHYHHGO <sup>b</sup> ILLKALKALAKAIL-NH <sub>2</sub>	C20	+11	+6

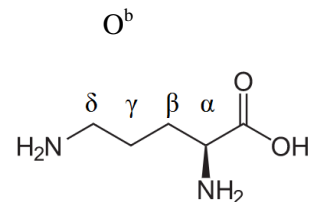
K<sup>a</sup>



\*QN



O<sup>b</sup>



### 2.2.2 Histidiinirikaste RSP-de keskkonna pH säilitamisvõime hindamine

Peptiidide keskkonna pH säilitamise võime ehk puhverdusvõime hindamiseks viidi läbi tiitrimisel põhinev eksperiment. Katse läbiviimiseks valmistati 5 ml 0,2 mM peptiidilahust. pH-meetriga mõõdeti esialgne peptiidilahuse pH. Seejärel lisati peptiidilahusele 20 µl 1 M trifluoroatseethapet (TFA), mis muutis peptiidilahuse happelisemaks kuni pH 2,5. Seejärel lisati samal ajal pidevalt magnetsegajaga segades lahusele 5 µl kaupna NaOH 0,5 M lahust kuni pH 11 saavutamiseni. Saadud andmete alusel

arvutati RSP-de puhverdusvõime pH vahemikus 5-7. Andmed esitati programmi Microsoft Excel graafikuna.

### 2.2.3 siRNA/RSP komplekside moodustamine

siRNA/RSP kompleksid moodustatakse 1 tund enne rakkudele lisamist. Kuna töös kasutatud peptiidide ja siRNA vahelised kompleksid moodustatakse mittekovalentselt, piisab vaid kahe lahuse kokkusegamisest ja inkubeerimisest. Seejuures võetakse arvesse molaarsuhet (MR). Molaarsuhe on suhe reaktsioonis osalevate ainete moolide vahel. Selles töös on kasutatud MR30, seega on peptiidi 30-kordses ülehulgas siRNA suhtes. Kokku segatakse siRNA ja peptiidilahus ning vajadusel lisatakse vajalikul hulgal deioniseeritud MQ (*Milli-Q water*) vett. siRNA lõppkontsentratsioon vastavalt katse iseloomule oli kas 25 nM või 100 nM ning RSP lõppkontsentratsioon kas 750 nM või 3 µM (Tabel 3).

**Tabel 3.** Komplekside moodustamine.

	siRNA	RSP	siRNA lõppkontsen tratsioon kompleksis	siRNA lõppkontsen tratsioon söötmes	RSP lõppkontsen tratsioon kompleksis	RSP lõppkontsen tratsioon söötmes
<b>MR</b>	40 µl 1 µM	120 µl 10 µM	250 nM	25 nM	7,5 µM	750 nM
<b>30</b>	40 µl 4 µM	120 µl 40 µM	1 µM	100 nM	30 µM	3 µM

**Tabel 4.** Töös kasutatud siRNA järjestused.

siLuc	<i>Sense</i>	5'-GGACGAGGACGAGCACUUCUU
	<i>Antisense</i>	3'-UUCCUGCUCUGCUCGUGAAG
siGFP	<i>Sense</i>	5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCACC
	<i>Antisense</i>	3'-UGCGCUCCUGGACGUAGCCUU

### 2.2.4 Kasutatud rakuliinid ja nende kultiveerimine

Töös kasutati rakuliine U87-luc2 (glioblastoomi rakud, mis stabiilselt ekspresseerivad luc2 geenilt lutsiferaasi) ja CHO-GFP (Hiina hamstri munasarjarakud, mis stabiilselt ekspresseerivad GFP valku), mida kasvatati inkubaatoris 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas. Rakke kasvatati Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) söötmes (U87-luc2 rakkude puhul) või Ham's-i söötmes (CHO-GFP rakkude puhul), millele oli lisatud 0,1 mM asendatavaid

aminohappeid, 1,0 mM naatriumpüruvaati, 10% veise looteserumit (FBS), 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini. U87-luc2 rakkude kasvatamiseks kasutati Petri tassi, mille põhi oli eelnevalt 0,1% želatiiniga töödeldud. Rakkude arvu plaadil vähendati iga 2-3 päeva järel passeerimisega suhtes 3:1-le söötmes, et säilitada rakutihedus alla 90%.

Rakukatsete jaoks külvati rakud 24-kaevulisele või 96-kaevulisele läbipaistvale plaadile 24 tundi enne eksperimendi läbiviimist. U87-luc2 rakuliini puhul plaadid eelnevalt želatiniseeriti. 24-kaevulise plaadi puhul oli rakkude kontsentratsioon 50 000 rakku/ml söötmes kaevu kohta ning 96-kaevulise plaadi puhul 10 000 rakku/200 µl söötmes kaevu kohta ja kasvatati inkubaatoris 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures.

#### **2.2.5 Rakukultuuris bioloogilise efekti hindamine luminesentsi baasil**

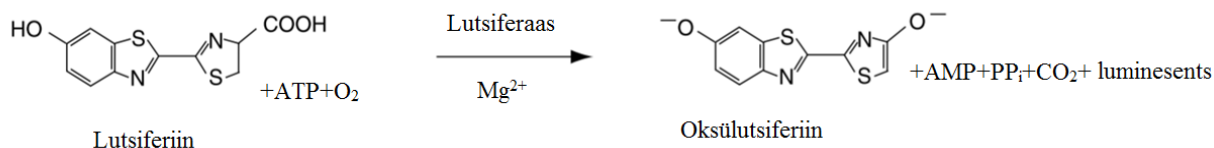
Transfektsiooni jaoks külvati rakud 24 tundi enne eksperimendi läbiviimist 24-kaevulisele läbipaistvale plaadile vastavalt punktis 2.2.4 toodule.

24 tunni möödudes vahetati rakkudel vana sööde 450 µl uue söötme vastu kaevu kohta. Seejärel pipeteeriti kaevudesse lisaks söötmele 50 µl komplekse, töötlemata kontrollrakkude kaevudesse pipeteeriti 50 µl söödet. Pärast 4 tunni möödumist lisati rakkudele 1 ml uut söödet kaevu kohta. Rakke inkubeeriti 20 tundi inkubaatoris 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures.

20 tunni möödudes eemaldati rakkudel sööde, pesti fosfaatpuhverdatud soolalahusega (1xPBS) ning lüüsiiti 100 µl 0,1% Triton-x 100-ga, mis oli lahjendatud 1xPBS-is. Lüüsimine kestis 30 minutit temperatuuril 4 °C.

Pärast 30 minuti möödumist pipeteeriti 20 µl rakulüsaati valgele 96-kaevulisele plaadile ning lisati 80 µl Luciferase Assay Reagent-i (Promega, Rootsi) ja mõõdeti luminomeetriga (Promega, Rootsi) luminesentsi lutsiferaasi hulga määramiseks (Joonis 4). Luminomeetriga mõõdetud tulemused normaliseeriti hiljem andmetöötluses vastavate proovide valgukontsentratsioonidega. Proovide valgukontsentratsioonide määramiseks kasutati valgumääramise komplekti Bio-Rad RC DC<sup>TM</sup> Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc, USA). Selle jaoks pipeteeriti 5 µl rakulüsaati läbipaistvale 96-kaevulisele plaadile ning lisati 25 µl Protein assay reagent A ja reagent S segu (1 ml Reagent A+20 µl Reagent S). Seejärel lisati proovidele 200 µl Protein assay reagent B ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti valgu absorptsioon Tecan Sunrise mikroplaadi lugejaga (Tecan Group Ltd, Šveits) lainepikkusel 700 nm. Luminomeetriga mõõdetud tulemused

normaliseeriti vastavate proovide valgukontsentratsiooni suhtes ning tulemused esitati GraphPad Prism programmi abil graafikuna.



**Joonis 4.** Lutsiferiini reageerimine lutsiferaasiga, mille käigus eraldub luminesents

#### 2.2.6 siRNA/RSP kompleksi stabiilsus hepariini soola suhtes

siRNA/RSP komplekside stabiilsuse hindamiseks töödeldi komplekse hepariinsoola lahusega, mis tõrjub kompleksidest siRNA välja tänu oma negatiivsele laengule. Eelnevalt moodustati siRNA/RSP MR30 kompleksid, kus siRNA lõppkontsentratsioon oli 25 nM. Kompleksid kanti 96-kaevulisele plaadile 30 µl kaevu kohta ja lisati 90 µl erineva kontsentratsiooniga hepariini (Sigma-Aldrich, Saksamaa) lahust MQ vees, mille lõppkontsentratsioonid jäid vahemikku 0-3 mg/ml. Seejärel inkubeeriti saadud lahust 45 minutit temperatuuril 37 °C. Pärast inkubeerimisaja lõppu lisati välja tõrjutud siRNA koguse hindamiseks 30 µl nukleiinhapete aluspaaride vahele seostuvat fluorokroomi PicoGreen® lahust (Thermo Fisher Scientific, USA). Pärast 15 minutilist inkubatsiooni toatemperatuuril mõõdeti fluoromeetriga (SynergyMx, BioTek, USA) hepariinile kättesaadava siRNA hulk 480/520 nm juures. Saadud tulemused normaliseeriti hepariin vastavate kontsentratsioonidega siRNA kontrollide suhtes ning esitati GraphPad Prism programmi abil protsentuaalse graafikuna.

#### 2.2.7 siRNA/RSP kompleksi stabiilsus ensüümi proteinaas K suhtes

siRNA/RSP komplekside stabiilsuse hindamiseks töödeldi komplekse proteinaas K ensüümiga, mis lõikab peptiidsidet hüdrofoobsete aminohapete juurest ning selle tulemusel vabaneb siRNA. Selle jaoks moodustati eelnevalt 30 µl siRNA/RSP MR30 kompleksid siRNA lõppkontsentratsiooniga 25 nM, mis lisati 90 µl MQ veele, mis oli eelnevalt kantud mustale 96-kaevulisele plaadile. Saadud lahusele lisati 30 µl PicoGreeni® (Thermo Fisher Scientific, USA) lahust. Proove inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Enne ensüümi proteinaas K lisamist mõõdeti nullproov, mis näitas kompleksi moodustumist ning mille vastu hiljem proovid normaliseeriti. Seejärel lisati 20 µl proteinaas K (Thermo Scientific, USA) ensüümi kontsentratsioonis 120 µl/ml. Fluoromeetriga (SynergyMx, BioTek, USA) mõõdeti kättesaadava siRNA hulk 485/528 nm juures. Mõõtmise teostati 200 minuti jooksul iga 5

minuti tagant. Tulemused normaliseeriti nullproovi suhtes, millele polnud proteinaas K lisatud ning esitati GraphPad Prism programmi abil protsentuaalse graafikuna.

#### **2.2.8 Läbivoolutsütomeetriaga transfekteritud rakupopulatsiooni määramine**

Selleks, et teada saada kui suur osa rakupopulatsioonist on siRNA/RSP komplekside vahendusel transfekteritud analüüsiti transfekteritud CHO-GFP rakke läbivoolutsütomeetria abil (*Fluorescence Activated Cell Sorter*, FACS). 24 tundi enne katse algust külvati CHO-GFP rakud 24-kaevulisele plaadile vastavalt punktis 2.2.4 kirjeldatule. Moodustati siRNA/RSP MR30 kompleksid, kus siRNA lõppkontsentratsioon oli 100nM. Rakud transfekteriti kompleksidega vastavalt punktis 2.2.5 kirjeldatule. 4 tunni möödudes lisati rakkudele 1 ml värsket söödet ning rakke inkubeeriti seejärel 44 tundi. Pärast 44 tundi inkubatsiooniaja möödumist eemaldati rakkudelt sööde ning lisati 100 µl trüpsiini kaevu kohta ning inkubeeriti 2 minutit. Seejärel lisati 400 µl 2% FBS-i lahjendatuna PBS-is (50 ml PBS+1 ml FBS), et neutraliseerida trüpsiin ning 200 µl rakususpensiooni kanti läbipaistvale 96-kaevulisele U-plaadile. Kuni mõõtmiseni hoiti rakke jääl. Fluorestsentsi intensiivsuse analüüsimiseks kasutati firma BD LSRII läbivoolutsütomeetrit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ning tarkvara FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg, Saksamaa). Tulemused esitati protsentuaalse graafikuna GraphPad Prism programmi abil.

#### **2.2.9 Konfokaalmirkoskoopiaga bioloogilise efekti visualiseerimine**

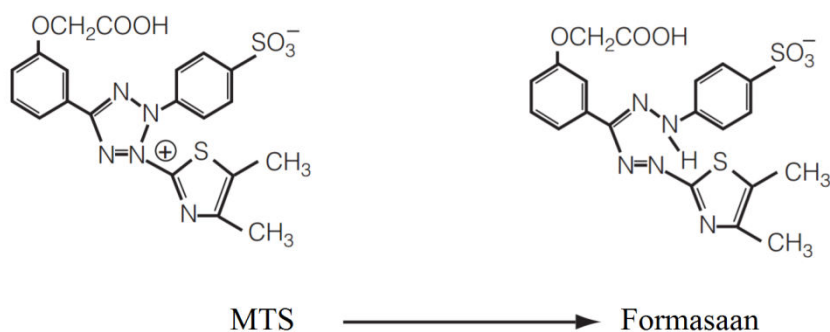
siRNA/RSP kompleksi GFP signaali maha reguleerimise efektiivsuse määramiseks kasutati lisaks lutsiferaasi hulga määramise eksperimendile, mis on kirjeldatud eelpool, konfokaalmikroskoopiat. 24 tundi enne katse läbiviimist külvati 10 000 CHO-GFP rakku 250 µl söötmes kambri kohta konfokaalmikroskoopia jaoks mõeldud Nunc™ Lab-Tek™ (Thermo Scientific™, USA) 8-kambrilistele alusklaasidele. Vahetult enne komplekside rakkudele kandmist vahetati vana sööde 225 µl värsket söötme vastu ning rakkudele kanti 25 µl siRNA/RSP komplekse, milles siRNA lõppkontsentratsioon oli 100nM. Pärast 24 tundi inkubeerimist tuvastati fluorestsentsignaali konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM710, visualiseerimiseks kasutati 488 nm laserit ning andmeid töödeldi hiljem ZEN tarkvaraga.

#### **2.2.10 Rakkude elumuse määramine**

RSP-de ja siRNA/RSP komplekside võimaliku toksilise efekti hindamine põhineb MTS proliferatsiooni analüüsil (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Rootsi). See on kolorimeetriline meetod, mis põhineb mitokondriaalsete dehüdrogenaaside aktiivsuse detekteerimisel metaboolselt aktiivsetes rakkudes.

Dehüdrogenaasid redutseerivad reaktsioonis osalevad tetrasooliumi soolad formasaaniks ning tekkinud produkti neelduvust on võimalik mõõta spektrofotomeetriliselt (Joonis 4).

Rakkude elumuse hindamiseks külvati 24 tundi enne katse läbiviimist läbipaistvale eelnevalt želatiniseeritud 96-kaevulisele plaadile U87-luc2 rakud vastavalt punktis 2.2.4 kirjeldatule. Enne siRNA/RSP komplekside või peptiidilahjenduste rakkudele kandmist vahetati vana sööde 90 µl värske söötme vastu. Seejärel kanti rakkudele 10 µl kaevu kohta eelnevalt moodustatud siRNA/RSP MR30 komplekse, kus siRNA lõppkontsentratsioon oli 25 nM või peptiidilahjendused kontsentratsioonis 10-0,625 µM. 24 tunni möödudes lisati rakkudele 20 µl MTS reagenti kaevu kohta ning pärast 2 tundi inkubeerimist mõõdeti tekkinud produkti absorptsioon Tecan Sunrise mikroplaadi lugejaga (Tecan Group Ltd, Šveits) lainepikkusel 450 nm. Tulemused normaliseeriti tausta ja negatiivsete proovide suhtes ning esitati GraphPad Prism programmi abil protsentuaalse graafikuna



**Joonis. 5** MTS-i ja formasaani struktuurid



## 2.3 Tulemused ja arutelu

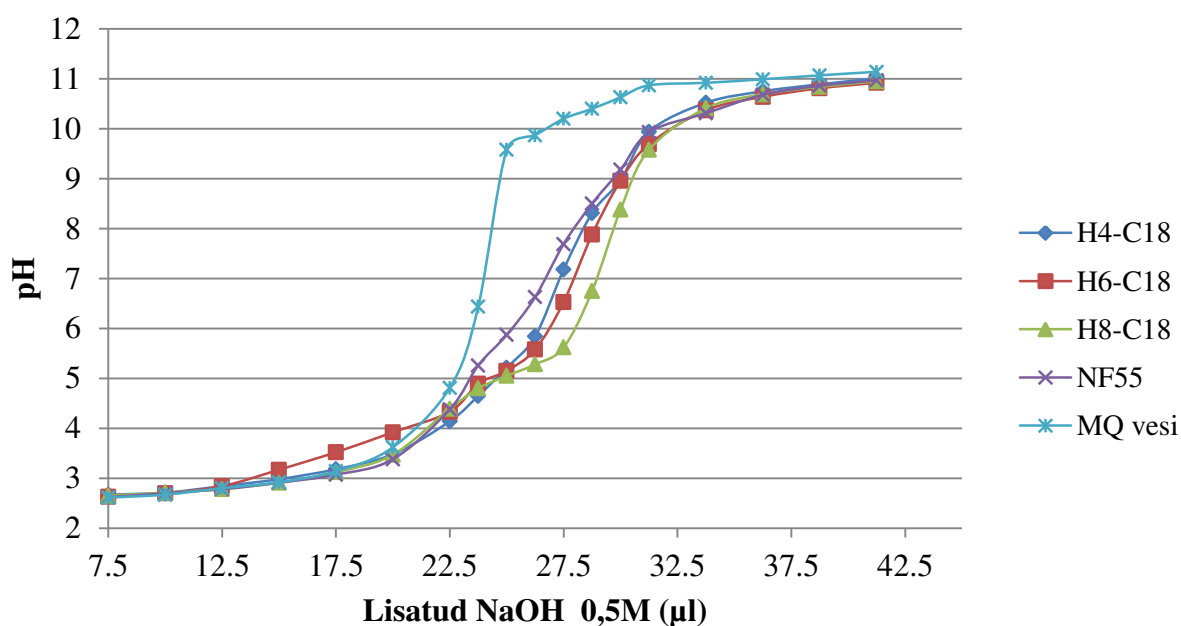
### 2.3.1 Keskkonna pH säilitamise võime sõltub histidiinide arvust RSP-s

Histidiine on lisatud RSP-dele nende pH-tundlikumaks muutmiseks. Kuna histidiini kõrvalahela pKa (6) on madalam võrreldes kahe teise positiivselt laetud aminohappe - lüsiini (10,53) ja arginiini (12,48) - kõrvalahela pKa-ga on histidiinirikkad peptiidid eriti tundlikud just madala pH suhtes (Moulay *et al.*, 2016). See tuleneb sellest, et histidiini imidasoolring on madalamal pH-l protoneeritud ning seega omandavad histidiine sisaldavad peptiidid happelises keskkonnas suurema positiivse üldlaengu. See tuleb kasuks negatiivselt laetud nukleinhappemolekulide, antud töö kontekstis siRNA-ga, ning rakumembraaniga interakteerumisel. Madalamal pH-l ehk happelises keskkonnas moodustunud siRNA/RSP komplekside puhul kulub positiivselt laetud RSP-d negatiivselt laetud siRNA tasakaalustamiseks vähem kui kõrgemal pH-l ehk aluselises keskkonnas. siRNA-ga kompleksi moodustumiseks kuluvate RSP-de arv sõltub RSP üldlaengust happelises keskkonnas - mida suurem on üldlaeng, seda vähem kulub RSP-d. Kuna histidiin on hüdrofiilne aminohape muudab nende lisamine järjestusse ka kogu peptiidi hüdrofiilsemaks. See aga vähendab RSP interakteerumise efektiivsust hüdro-fiilse rakumembraani pealispinnaga. Selle probleemi lahendamiseks ning RSP-de hüdrofoobsemaks muutmiseks lisatakse peptiidjärjestuse N-terminaalsesse osasse erineva pikkusega rasvhappejääke (Lehto *et al.*, 2011).

Samuti omavad pH-tundlikud RSP-d puhverduisvõimet, mis on omadus välistegurite muutudes stabiilselt säilitada esialgne keskkonna pH seda puhverdades. Nii väldivad peptiidid endosoomide hapustumist ning seega kaitsevad end happelises keskkonnas aktiveeruvate lüütiliste ensüümides eest (Lo ja Wang, 2008).

Töös kasutatud RSP-de keskkonna pH säilitamise võime hindamiseks viidi läbi tiitrimisel põhinev katse. Valmistati 0,2 mM peptiidilahused, mida tiitriti 0,5 M NaOH lahusega. Katses kasutatud RSP-d olid valitud vastavalt histidiinide arvule peptiidahelas - 0, 4, 6, ja 8 histidiini. Kõikide RSP-de rasvhappejäägiks N-terminaalses osas oli stearoüülhappejääk, milles on 18 süsinikku. Tulemused esitati Microsoft Exceli graafikuna (Joonis 6). Tiitrimiskatses saadud tulemustest arvutati välja töös kasutatud RSP-dele lisatava NaOH hulk moolides, mis on vajalik, et viia pH 7-ni. pH vahemik, milleks oli 5-7, valiti histidiini kõrvalahela pKa (6) järgi, sest kõige tõenäolisemalt just selles vahemikus toimub histidiini imidasoolringi protonatsiooni muutus ning väheneb peptiidi üldlaeng. Saadud puhverduisvõimed on esitatud tabelis 5, millest on näha, et NF55 keskkonna pH säilitamise

võime võrreldes histidiinirikaste peptiididega on madalam ehk puhverdusvõime on väiksem. Histidiinirikastest peptiididest puhverdas kõige halvemini peptiid H4-C18, mille ahelas on 4 histidiini ja kõige paremini H8-C18, mille ahelas on 8 histidiini. Seega sõltub keskkonna pH säilitamise võime histidiinide arvust peptiidahelas - mida rohkem histidiine ahelas, seda suurem on ka peptiidi võime säilitada keskkonna pH. Seega aitab histidiinide lisamine järjestusse kaasa RSP-de pH-tundlikumaks muutmisele - histidiinirikad peptiidid suudavad säilitada keskkonna pH happelistes tingimustes muutumatuna ning tõenäoliselt suudavad seega vältida lagundamist happelises keskkonnas töötavate katalüütiliste ensüümide poolt ning edukamalt vabaneda endosoomidest.



**Joonis 6.** RSP-de H4-C18, H6-C18, H8-C18 ja kontrollina kasutatud NF55 tiitrimiskõverad.

**Tabel 5.** Peptiidide puhverdusvõimed.

	4 histidiiniga RSP	6 histidiiniga RSP	8 histidiiniga RSP	NF55	MQ vesi
<b>Puhverdusvõime (µmol)</b>	6,8	7,0	7,2	6,7	6,0

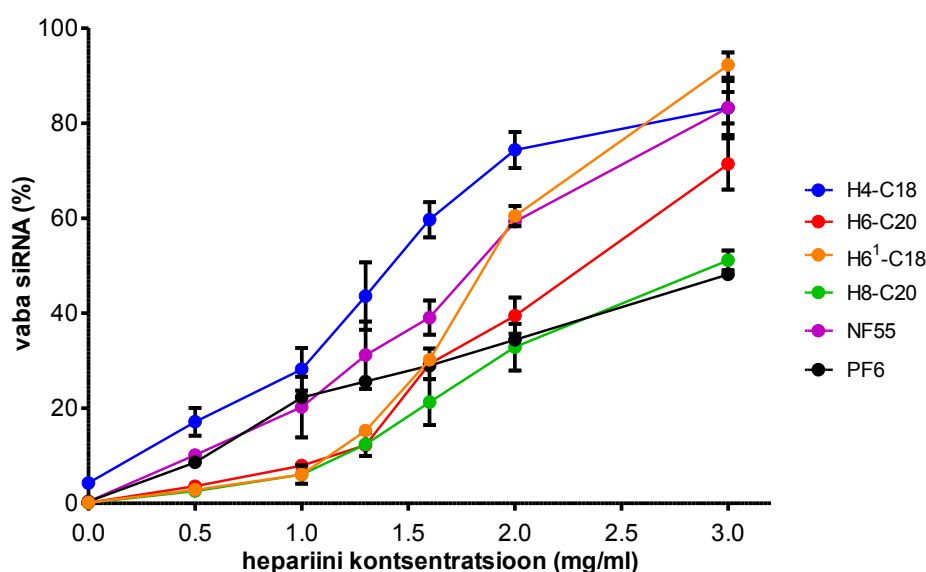
### 2.3.2 Histidiinide lisamine RSP-le suurendab siRNA/RSP kompleksi stabiilsust

RSP-de kasutamiseks *in vitro* ja *in vivo* katsetes on oluline, et kompleks oleks optimaalse stabiilsusega. Lastmolekul ei tohi olla peptiidiga seotud ei liiga tugevasti ega liiga nõrgalt. Optimaalse seotuse korral vabaneb lastmolekul RSP küljest alles pärast rakumembraani läbimist (Viola *et al.*, 2010). Kompleksi stabiilsus on oluline soovitud

bioloogilise efekti saavutamiseks. Liiga stabiilse kompleksi puhul vabaneb lastmolekul RSP küljest raskemalt ning bioloogiline efekt ei pruugi avalduda soovitud määral. Liiga nõrga kompleksi puhul aga võib lastmolekul vabaneda enne rakumembraani läbimist, millega jällegi ei kaasne soovitud bioloogilist efekti, sest lastmolekul ei jõua sihtmärkorganellini.

Histidiinid suurendavad siRNA/RSP vahelise kompleksi stabiilsust positiivsete lisalaengutega, mis tekivad happelises keskkonnas tänu histidiini kõrvalahela protoneeritusele. Seega on kompleksi stabiilsus mõjutatud ka pH-st, sest aluselisema pH juures on peptiidi üldlaeng väiksem ning kompleksi stabiilsus seega madalam.

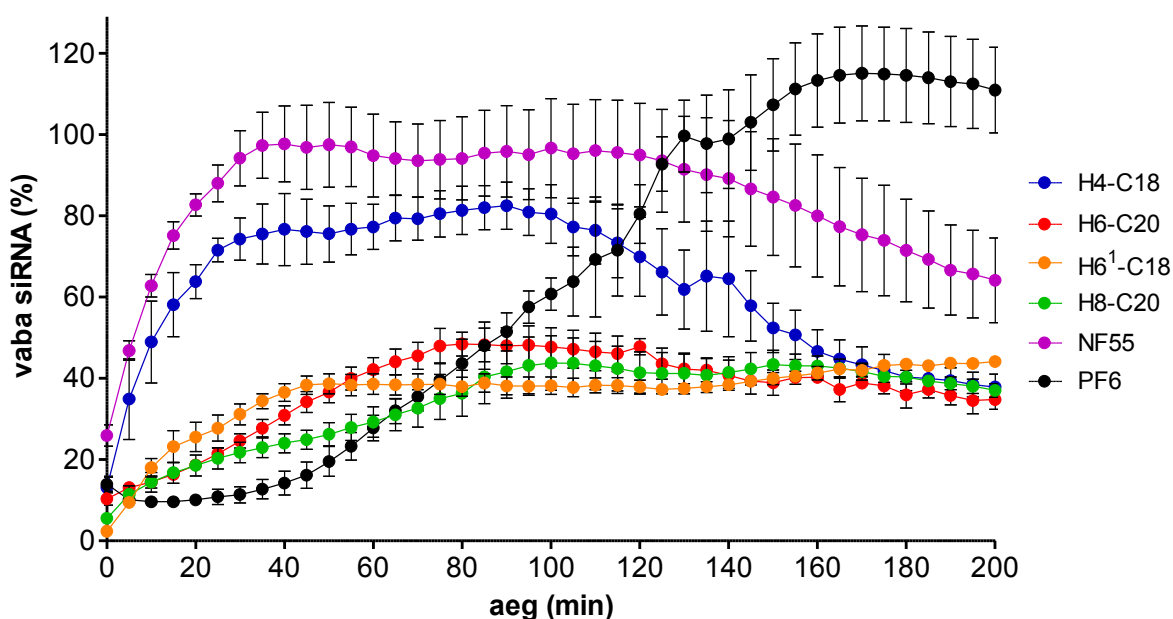
siRNA/RSP komplekside stabiilsuse hindamiseks viidi läbi katse, milles komplekse inkubeeriti hepariini soola juuresolekul, mis näitab kui tugevasti siRNA on seotud kompleksi. Katse teostati rakusisese pH juures, mis on 6 ehk kergelt happeline. Hepariin on polüanioonne ühend, mis on võimeline seostuma positiivselt laetud aminohapetega ning tõrjub seeläbi kompleksist välja nukleiinhappe. Hepariini kontsentratsioon, millel tõrjutakse välja nukleiinhape ja välja tõrjumise käigus vabanenud siRNA hulk iseloomustavad kompleksi stabiilsust. Kompleksid moodustati MR30 juures ning siRNA lõppkontsentratsioon kompleksis oli 25 nM, mis on sama, mida kasutati *in vitro* katsetes. Komplekse töödeldi erineval kontsentratsioonidel hepariini lahustega (0-3 mg/ml). Välja tõrjutud siRNA koguse hindamiseks töödeldi saadud lahust PicoGreen® lahusega. Välja tõrjutud vaba siRNA hulk esitati protsentuaalselt graafikuna kasutades GraphPad Prism programmi (Joonis 7). Tulemused on esitatud kahe katse keskmisena.



**Joonis 7.** siRNA/RSP komplekside stabiilsus hepariini soolade juuresolekul.

Katse tulemustest järeldub, et tugevaima kompleksi moodustab H8-C20, mis tähendab, et siRNA/H8-C20 kompleksist suudab hepariin siRNA kõige halvemini välja tõrjuda. Kõige nõrgema kompleksi moodustab seevastu H4-C18, mis vabastab siRNA oma kompleksist hepariini soola juuresolekul kõige kergemini. Keskmise tugevusega kompleksi, mis pole ei liiga tugev ega liiga nõrk moodustavad H6-C20 ja H6<sup>1</sup>-C20, mis võrreldes NF55 on stabiilsemad, kuid PF6-ga võrreldes siiski nõrgemad.

Teise katsena, et hinnata siRNA/RSP komplekside vastupidavust proteolüütilisel lagundamisele ning RSP võimet kaitsta lastmolekuli, teostati katse, milles siRNA/RSP komplekse töödeldi ensüümiga proteinaas K. Katse viidi läbi rakusisese pH juures, mis on 6 ehk kergelt happeline. Proteinaas K on ensüüm, mis lõikab peptiidsidet ning selle käigus vabaneb kompleksist siRNA. Katse viidi läbi MR30 juures ning siRNA lõppkontsentratsioon kompleksis oli sama, mis *in vitro* katsetes. Vabanenud siRNA koguse määramiseks töödeldi proove PicoGreen® lahusega. Välja tõrjutud vaba siRNA hulk esitati protsentuaalselt graafikuna kasutades GraphPad Prism programmi (Joonis 8). Tulemused on esitatud kahe katse keskmisena.



**Joonis 8.** siRNA/RSP komplekside stabiilsus ensüümi proteinaas K juuresolekul.

Katse tulemusest järeldub, et proteinaas K juuresolekul vabaneb siRNA kõige paremini siRNA/H4-C18 kompleksist ehk seega peab RSP H4-C18 kõige vähem vastu proteolüütilisele lagundamisele, kuid on siiski stabiilsem kui NF55. Keskmise tugevusega kompleksid moodustavad H6-C20 ja H6<sup>1</sup>-C18. Neist kõige tugevam on siRNA/H8-C20

kompleks, milles RSP peab kõige paremini vastu proteolüütilisele lagundamisele ning kaitseb lastmolekuli kõige paremini.

Nende kahe eksperimendi tulemuste põhjal saab väita, et nii positiivselt laetud histidiinid peptiidahelas kui ka hüdrofoobne osa rasvhappejäägi näol mõjutavad siRNA/RSP kompleksi tugevust. Katsetest saab järeldada, et mida rohkem on peptiidahelas histidiine ning mida pikem on rasvhappejääk, seda tugevama kompleksi RSP moodustab ja seda raskemalt vabaneb lastmolekul. Lühikema rasvhappejäägi ja väiksema arvu histidiinide puhul vabaneb lastmolekul aga kergemini. Nii hepariini soolade kui ka ensüümi proteinaas K juuresolekul moodustas keskmise tugevusega kompleksi, mis poleks ei liialt nõrk ega tugev, RSP H6-C20. Nimetatud kompleksi optimaalne stabiilsus on tingitud ilmselt peptiidahelates olevatest 6-st positiivsest histidiinist, mis muudavad peptiidi üldlaengu positiivsemaks. Suurem positiivne üldlaeng aitab kaasa interakteerumisele negatiivse siRNAga - seega suurema üldlaenguga RSP-d kulub sama hulga siRNA-ga interakteerumiseks vähem. Samuti aitab keskmise tugevusega kompleksi moodustumisele kaasa hüdrofoobne regioon, mille tagab N-terminaalses pooles olev arahoiüülhappejäägi osa ning mis stabiliseerib peptiidahelas olevaid hüdrofiilseid aminohappejääke, nende hulgas ka histidiine.

### 2.3.3 Edukamad transportvektorid on 4 ja 6 histidiiniga RSP-d

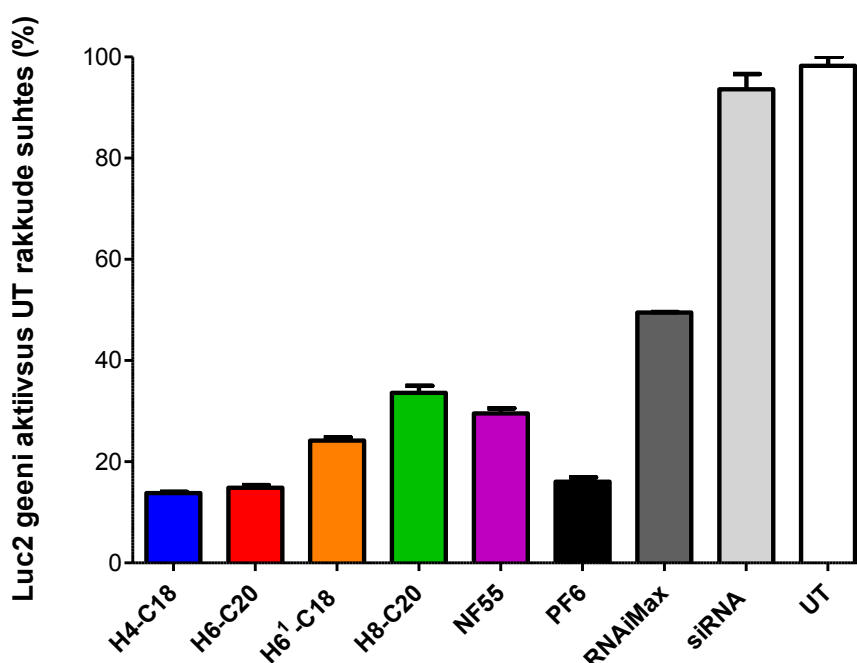
Transfektsiooni efektiivsus on üks põhilisi parameetreid, millega on võimalik hinnata transportvektori võimet viia rakkudesse lastmolekul. Transfektsiooni efektiivsus sõltub mitmetest teguritest nagu vektorina kasutatava RSP järjestus, transporditav lastmolekul, kompleksi stabiilsus ning transfekteeeritavast rakuliinist ja inkubatsioonitingimustest. Lõplik bioloogiline aktiivsus omakorda sõltub transfektsiooni efektiivsusest, endosoomidest vabanemise edukusest, siRNA/RSP komplekside stabiilsusest ning tsütoplasmasse vabanenud siRNA efektist.

Üks aspekt, millest transfektsiooni ja soovitud bioloogilise efekti saavutamise efektiivsus *in vitro* sõltub, on siRNA/RSP kompleksi stabiilsus. Kuna siRNA/RSP komplekside töötlemisel hepariini soolade ja ensüümiga proteinaas K selgus, et keskmise tugevusega kompleksi, mis poleks ei liialt nõrk ega liialt tugev, moodustab RSP H6-C20, peaks see peptiid olema kõige efektiivsem siRNA transporter transfektsioonikatsetes.

Teine tegur, millest transfektsiooni ja soovitud bioloogilise efekti saavutamise efektiivsus *in vitro* sõltub, on kasutatava RSP kontsentratsioon, mis on rakuliinilt erinev. Kasutatav kontsentratsioon oleneb näiteks sellest, milline on sihtmärkgeeni valgulise produkti

iseloom. Näiteks sihtmärkgeeni valgulise produkti poolväärtusajast sõltub, kui pikk on inkubatsiooniaeg; lühema poolväärtusajaga sihtmärgid vajavad ka lühemat inkubatsiooniaeg.

Transfektsiooni efektiivsuse ning bioloogilise efekti saavutamise hindamiseks teostati lutsiferaasi hulga mõõtmisel põhinev katse. Eksperimendi teostamiseks kasutati U87-luc2 rakuliini, mis ekspresseerib lutsiferaasi. Katse eesmärgiks oli maha reguleerida lutsiferaasi kodeeriv geen. siLuc/RSP kompleksid moodustati suhtes MR30 ning siLuc lõppkontsentratsioon oli 25 nM. Rakkudele lisatud siLuc/RSP kompleksid moodustasid 1/10 rakkudel olevast söötme ruumalast. Inkubatsiooniajaks valiti 24 tundi, sest lutsiferaasi poolväärtusaeg on umbes 4 tundi ning seega peaks olema 24 tundi piisav aeg, millega saavutada soovitud bioloogiline efekt. Lutsiferaasi hulka rakkudes mõõdeti luminesentsi kaudu luminomeetriga ja tulemused normaliseeriti vastavate rakkude valgusisalduse vastu, et elimineerida rakkude arvust tulenevad ebatäpsused. Tulemused esitati GraphPad Prism programmi kasutades tulpdiagrammil suhtelise luminesentsi ühikutena (*relative luminescence unit*, RLU) (Joonis 9). Tulemused on esitatud kahe katse keskmisena.



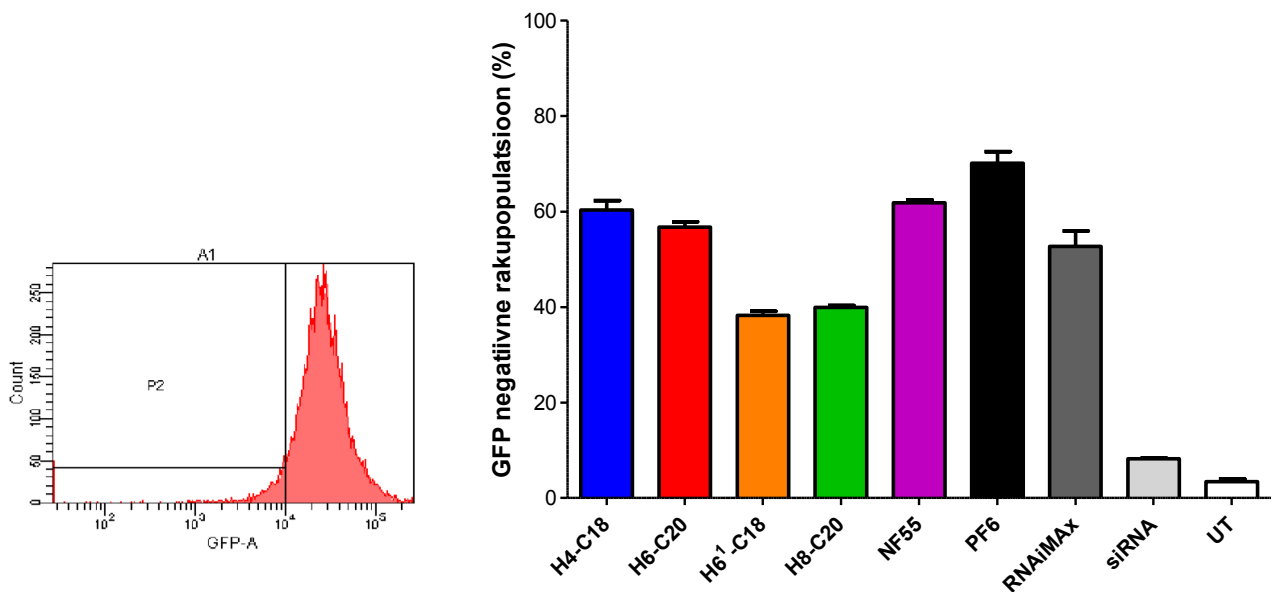
**Joonis 9.** siLuc/RSP kompleksidega luc2 geeni mahareguleerimine U87-luc2 rakkudes. Tulemused on normaliseeritud vastavate proovide valgukontsentratsiooni vastu.

Transfektsioonikatsest järeldus, et kõige efektiivsemalt reguleerivad luc2 geeni maha siLuc/H4-C18 ja siLuc/H6-C20 kompleksid, mille puhul luc2 geeni avaldumise tase rakkudes oli üsna võrdne, jäädes 15% juurde. See tulemus on võrdne varem edukat siRNA transporti

näidanud RSP PF6 tulemusega antud katses. Kõige ebaefektiivsemalt töötas peptiid H8-C20, mille transfektsiooni efektiivsus oli katses kasutatud peptiididest madalaim. Kõikide katses kasutatud RSP-de transfektsiooni efektiivsus ületas kommertsiaalse transfektsiooniagendi RNAiMAX efektiivsuse. Kõik histididiinidega modifitseeritud RSP-d ületasid NF55 bioloogilise efekti saavutamise võime, reguleerides lutsiferaasi kodeerivat geeni maha suuremal määral.

Lisaks üldisele transfektsiooni efektiivsuse ja bioloogilise efekti hindamisele, mis teostati lutsiferaasi hulga määramise kaudu, on oluline ka määrata täpsemalt, kui suure osa rakupopulatsioonist suudab transportvektor transfekteeida. Selle jaoks transfekteeiti CHO-GFP rakke, mis ekspresseerivad GFP valku, MR30 siGFP/RSP kompleksidega, milles siRNA lõppkontsentratsioon oli 100 nM, eesmärgiga vaigistavad rakkudes GFP valku kodeeriv geen. 100 nM lõppkontsentratsiooniga siGFP kasutati, sest selle kontsentratsiooni juures tulid töös kasutatud RSP-dega saavutatud bioloogilise efekti erinevused paremini välja kui 25 nM siGFP lõppkontsentratsiooniga läbi viidud katses (Lisa1). Läbivoolutsütomeetria teostamisele eelnenud transfektsiooni efektiivsuse määramise katse tulemust saab näha antud töö lisas 2. Inkubatsiooniajaks valiti 48 tundi, sest GFP poolestusaeg on 24 tundi ning lühema katseaja jooksul ei pruugi soovitud bioloogiline efekt veel avalduda. 48 tundi pärast transfektsiooni läbiviimist teostati katse kasutades läbivoolutsütomeetriat, mille eesmärgiks oli leida kui suur osa rakupopulatsioonist on muutunud GFP-negatiivseks võrreldes GFP-positiivse rakupopulatsiooniga. Piiriks seati fluorestsentsi intensiivsus hulgal  $10^4$ , mis tähendab, et GFP-negatiivseteks loeti kõik rakud allpool seda piiri (Joonis 10). Tulemused esitati protsentuaalse graafikuna kasutades GraphPad Prism programmi (Joonis 10) ning on esitatud kahe katse keskmisena.

Jooniselt 10 on näha, et edukaimalt on CHO-GFP rakkudes GFP-positiivse signaali maha surunud RSP-dega H4-C18 ja H6-C20 transporditud siGFP, mille puhul GFP-negatiivsete rakkude hulk võrrelduna GFP-positiivsete rakkudega jääb ligikaudu 60% juurde. Sama tulemuse andis ka kontrollina kasutatud NF55. Antud peptiidide efektiivsus jääb samale tasemele või veidi kõrgemale võrreldes kommertsiaalse transfektsiooniagendi RNAiMax efektiivsusega. Kõige madalama tulemuse antud katses andsid kompleksid, mis olid moodustatud RSP-dega H6<sup>1</sup>-C18 ja H8-C20 - nende kompleksidega töödeldud GFP-negatiivsete rakkude hulk võrreldes GFP-positiivsete rakkudega jäi ligikaudu 40% juurde, olles madalam NF55 tulemusest. Antud katses transfekteeis 70% rakupopulatsioonist kontrollina kasutatud PF6.

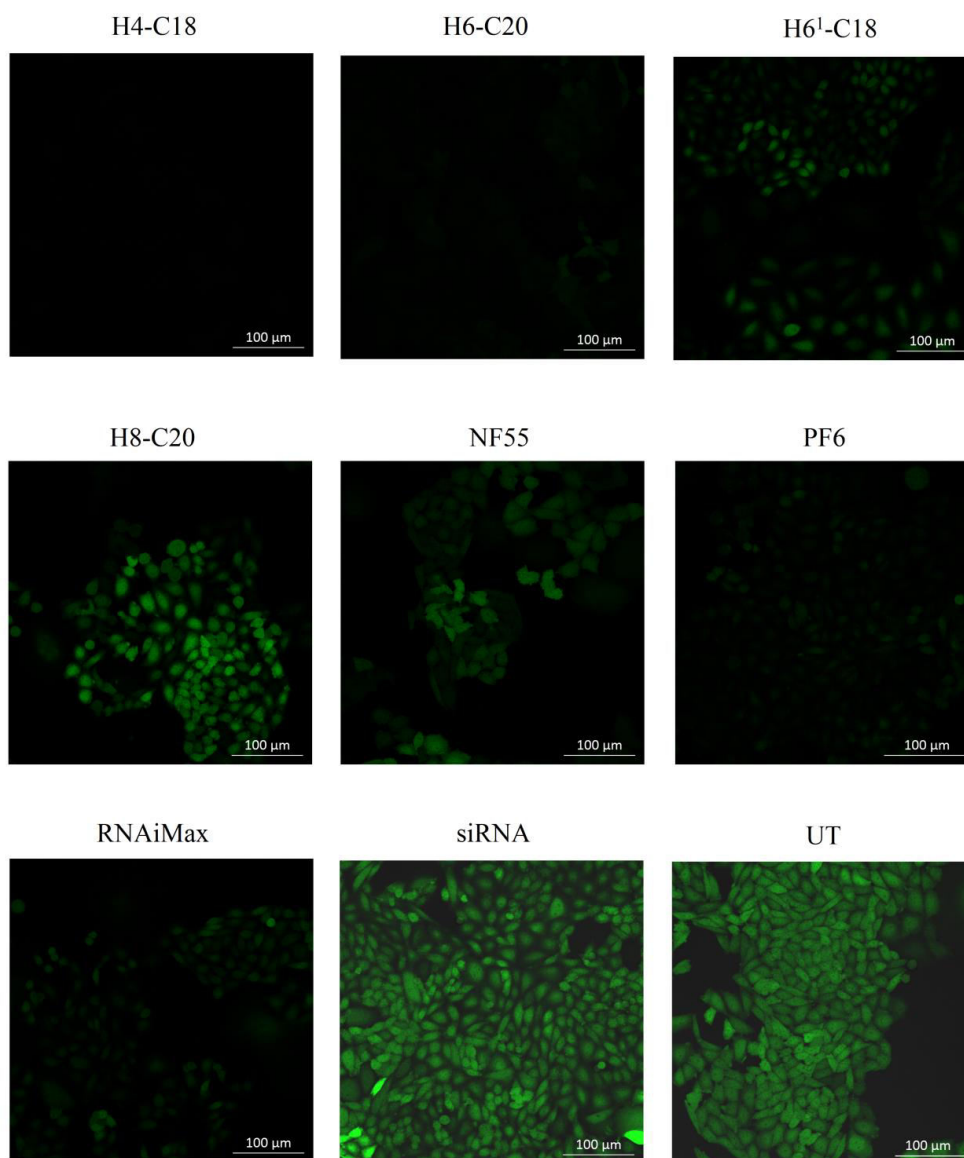


**Joonis 10.** Vasakul näide läbivoolutsütomeetria graafikust, millel on fluorestsentsi intensiivsuse hulk seatud  $10^4$ -le. Paremalt CHO-GFP-negatiivsete rakkude populatsioon võrrelduna CHO-GFP-positiivsete rakkude populatsiooniga. Mõõdetud läbivoolutsütomeetria järel 48 tundi transfektsiooni.

Kolmandaks teostati transfektsioon konfokaalmikroskoopia jaoks CHO-GFP rakkudega, et hinnata ning visualiseerida RSP-de transfektsiooni efektiivsust. Aluseks võeti eelnevalt teostatud transfektsioonikatse (Lisa 2) ja läbivoolutsütomeetria tulemused (Joonis 10) ning moodustati siGFP/RSP kompleksid MR30 juures, siGFP lõppkontsentratsioon oli 100 nM. Rakke inkubeeriti kompleksidega 48 tundi ning vaadeldi seejärel konfokaalmikroskoobiga. Saadud andmeid töödeldi ZEN tarkvaraga ning saadud tulemused on näha joonisel 11.

Konfokaalmikroskoopia fotodelt (Joonis 11) on visuaalselt näha siGFP/RSP komplekside transfektsiooni edukus ning bioloogiline efekt, milleks oli GFP valku kodeeriva geeni maha reguleerimine. Tulemus vastab eelnevalt läbi viidud transfektsiooni efektiivsuse määramise katse ja läbivoolutsütomeetria järel transfektsiooni rakupopulatsiooni suuruse hindamise katse tulemustele, kus parimateks osutusid H4-C18 ja H6-C20. Konfokaalmikroskoopia fotodelt on näha, et siGFP/H4-C18 ja siGFP/H6-C20 kompleksidega töödeldud rakkude puhul ei ekspresseeri rakud GFP valku peaaegu üldse ehk ei ole näha või on vähesel määral näha roheliselt värvunud rakke.





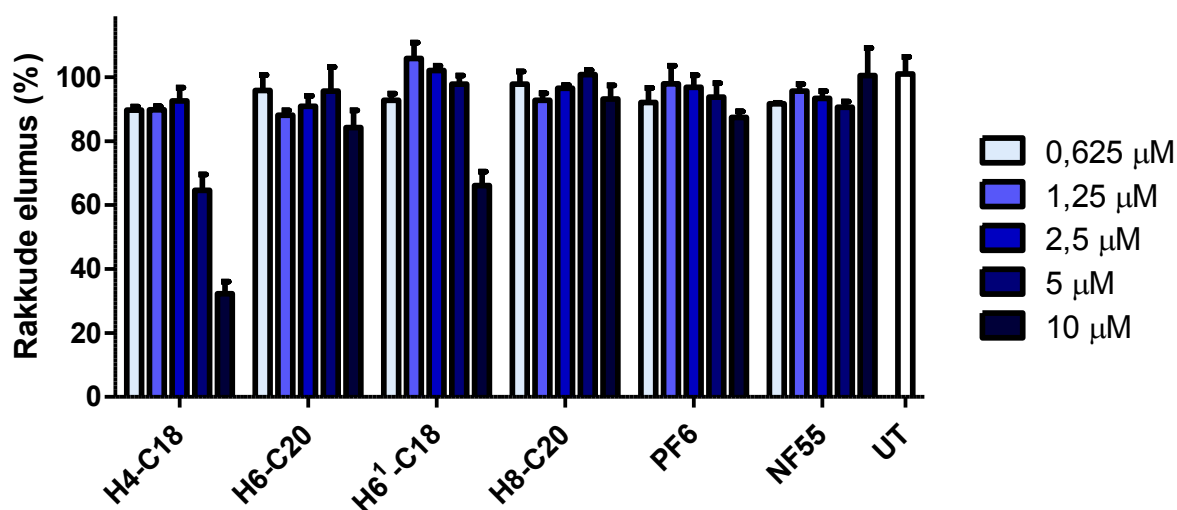
**Joonis 11.** Konfokaalmikroskoopia fotod, mis on tehtud 48 tundi pärast siGFP/RSP komplekside transfekteerimist CHO-GFP rakkudesse.

Saavutamaks soovitud bioloogilist efekti peab transportvektor viima siRNA raku tsütoplasmasse ning kaitsma seda nukleasidest eest (Cerrato *et al.*, 2014). Kõik töös kasutatud RSP-d moodustavad siRNA-ga komplekse, mille stabiilsusele aitavad kaasa peptidaheladele olevad histidiinid. Kuigi rohkem histidiini sisaldavad peptiidid moodustavad stabiilsemaid komplekse, ei ole need RSP-d siRNA-ga saavutatud bioloogilise efekti seisukohast kõige edukamad, sest ei vabasta siRNA-t piisaval määral. Oluline on, et peptiid suudaks lastmolekuli kaitsta, transportida ning sihtmärgini jõudes ka vabastada. Nii lutsiferaasi hulga määramise, läbivoolutsütomeetriaga määratud transfekteeritud rakupopulatsiooni suuruse kui ka visualiseerivate konfokaalmikroskoopia tulemuste põhjal saab väita, et edukaimalt on siRNA-t rakkudesse transportinud ning soovitud bioloogilist efekti saavutanud siRNA/RSP kompleksid, milles kasutati peptiide H4-C18 ja H6-C20.

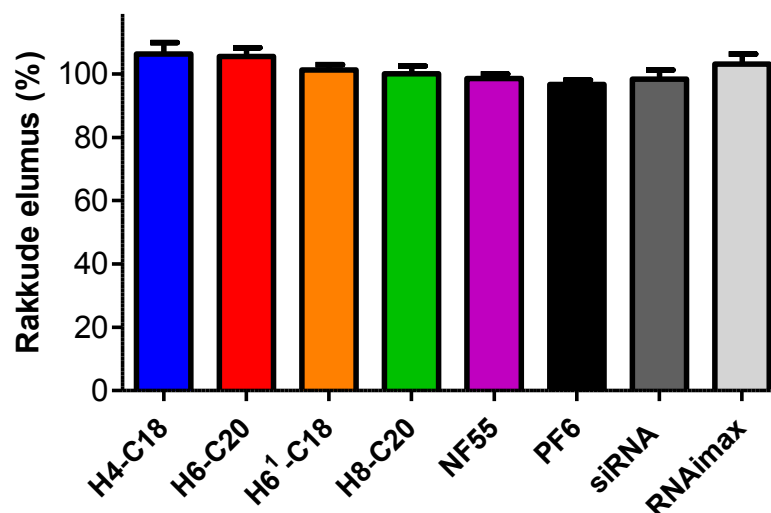
### 2.3.4 Histidiinirikkad RSP-d ei mõjuta oluliselt rakkude elumust

RSP-d peetakse mittetoksilisteks transportvektoriteks, mis ei mõjuta rakkude elumust. Varasemalt on näidatud NF perekonda kuuluvad RSP-d ei ole rakkudele toksilised ega mõjuta nende elumust (Arukuusk *et al.*, 2013). Rakkude elumust on transfektsiooni järgselt vaja määrata selleks, et hinnata transportvektori ohutust rakkudele. Kui juba *in vitro* tingimustes on transportvektor rakkude elumusele kahjulik on see seda suure tõenäosusega ka *in vivo* tingimustes, kus ohutus rakkude elumusele mängib juba suuremat rolli.

Antud töös hinnati siRNA/RSP komplekside mõju U87-luc2 rakkude elumusele. Selleks teostati eksperiment, mis põhineb mitokondriaalsete dehüdrogenaaside aktiivsuse detekteerimisel metaboolset aktiivsetes rakkudes. Dehüdrogenaasid redutseerivad reaktsioonis osaleva tetrasooliumi soolad formasaaniks. Teostati kaks katset - üks peptiidi lahjendusreaga ning teine siRNA/RSP kompleksidega. Peptiidilahuste lõppkontsentratsioon oli 0,625-10  $\mu\text{M}$  ning kompleksid moodustati suhtes MR30, kus siRNA lõppkontsentratsioon oli 25 nM. Rakkudele lisatud siRNA/RSP kompleksid moodustasid 1/10 rakkudel olevast söötme ruumalast. Tulemused esitati protsentuaalse graafikuga kasutades GraphPad Prism programmi (Joonis 12 ja 13). Tulemused on esitatud kahe katse keskmisena.



**Joonis 12.** U87-luc2 rakkude elumus pärast erinevate peptiidilahjenduste töötlust. Määratud MTS proliferatsiooni analüüsi abil 24 tundi peale peptiidilahjenduste rakkudele kandmist.



**Joonis 13.** U87-luc2 rakkude elumus siRNA/RSP kompleksidega töödeldes. RSP lõppkontsentratsioon 750 nM. Määratud MTS proliferatsiooni analüüsi abil 24 tundi peale komplekside rakkudele kandmist.

Katse tulemustest järeldub, et peptiidilahuse kontsentratsiooni kasvades muutub ka peptiidide mõju rakkudel toksilisemaks. Kõige enam mõjutas rakkude elumust RSP H4-C18, mille puhul 10  $\mu$ M peptiidilahuse puhul jäi ellu kõigest 35% kogu rakupopulatsioonist. Kõige vähem mõjutas rakkude elumust RSP H8-C20, kus isegi kõige kõrgemas kontsentratsioonis kasutatud RSP lahuse puhul jäi rakkude elumus üle 80%. Antud töös on kasutatud *in vitro* katsetes peptiidilahuseid, mille lõppkontsentratsioon rakkusöötmes on kas 750 nM või 3  $\mu$ M. Jooniselt 12 näeb, et mitte kummagi *in vitro* katsetes kasutatud peptiidi lõppkontsentratsioon ei oma rakkude elumusele kahjulikku mõju. Samuti kinnitab seda joonis 13, kus on näidatud rakkude elumus siRNA/RSP kompleksidega töötlusel. Katses kasutatud RSP-de kontsentratsioon oli 750 nM, mida kasutati ka teiste *in vitro* katsete puhul. Seega võib öelda, et MR30 komplekside kasutamine antud kontsentratsioonidel ei mõjuta rakkude elumust ning teoreetiliselt on histidiinirikkad peptiidid ohutud ka kasutamiseks *in vivo* tingimustes.

Kõikide teostatud eksperimentide baasil võib järeldada, et histidiinide arv peptiidahelas mõjutab RSP-de omadusi nagu keskkonna pH säilitamise võime, komplekside stabiilsus ning rakkudesse sisenemise efektiivsus ja soovitud bioloogilise efekti saavutamise võime.

Antud bakalaureusetöö tulemused kinnitasid, et histidiinide lisamine peptiidahelasse muudab RSP-d pH-tundlikuks, mida on ka varasemalt näidatud. See tähendab, et happelise

pH juures on histidiinid protoneeritud ning peptiid omab suuremat üldlaengut, samuti kaitsevad end lagundamise eest ning hoiavad keskkonna pH muutumatu seda puhverdades. Näiteks suurendas histidiinide lisamine RSP-le PF3 selle pH-tundlikkust ning bioloogilise efekti saavutamise efektiivsust (Regberg *et al.*, 2015).

Käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et histidiinide arvust peptiidahelas sõltub RSP võime säilitada keskkonna pH. Tiitrimisel põhinev katse tõestas, et mida rohkem on peptiidahelas histidiine, seda kergem on RSP-l säilitada keskkonna pH (vaata punkti 2.3.1). Seega suudavad RSP-d, mis sisaldavad rohkem histidiine, pidada kergemini vastu happelises keskkonnas, sest histidiini kõrvalahela deprotoneerimine ja sellega seoses ka peptiidi üldlaengu vähenemine võtab kauem aega. Sellised RSP-d, mille üldlaeng on happelises keskkonnas suurem suudavad endaga siduda suuremal hulgal negatiivselt laetud siRNA molekule ning edukamalt interakteeruda rakumembraaniga. Tõenäoliselt aitab pH-tundlikus kaasa RSP-de vabanemisele endosoomidest, sest RSP-d suudavad nii kergemini vastu panna endosoomide happelisele keskkonnale seda puhvedades ja seega kaitsta end madala pH juures aktiveeruvate ensüümide eest.

Kuna histidiin on hüdrofiilne aminohape suurendab nende lisamine peptiidahelasse RSP hüdrofiilsust, vähendades RSP võimet interakteeruda raku plasmamembraani pealispinnaga, mis on samuti hüdrofiilne. Seega on RSP-de järjestuses olevaid hüdrofiilseid aminohappejääke vaja tasakaalustada hüdrofoobse rasvhappejäägi lisamisega. Nii nagu käesolev bakalaureusetöö on ka varasemad tööd on tõestanud, et hüdrofoobse rasvhappejäägi lisamine tõstab RSP bioloogilise efekti saavutamise efektiivsust. (Mäe *et al.*, 2009).

Töös teostatud katsetulemused näitavad, et histidiinide lisamine RSP-le NF55 parandab selle bioloogilise efekti saavutamise edukust, mis tõestati siRNA/RSP komplekside transfektsiooniga kahte erinevasse rakuliini (vaata punkti 2.3.3). Transfektsiooni efektiivsus sõltub sellest, kui tugeva kompleksi moodustab RSP siRNA-ga ning seda mõjutab histidiinide arv peptiidahelas (vaata punkti 2.3.2) - rohkema arvu histidiinidega RSP-d moodustasid tugevamaid komplekse. Keskmise tugevusega kompleksi, mis poleks ei liiga tugev ega liiga nõrk moodustas RSP, mille ahelas on 6 histidiini. 4 histidiiniga RSP puhul vabanes siRNA kompleksist kergemini ning 8 histidiini puhul raskemalt. Seega võib arvata, et 8 histidiiniga RSP hoiab siRNA-t kompleksis liialt tugevalt ning seetõttu on soovitud bioloogilise efekti saavutamine raskem, sest ei vabane piisaval hulgal siRNA-t. Seda tõestavad ka in vitro katsed, kus edukamad olid nõrga ja keskmise tugevusega kompleksi moodustanud RSP-d H4-C18 ja H6-C20, milles on vastavalt 4 ja 6 histidiini.

Varasemalt on näidatud, et RSP-d on mittetoksilised transportvektorid, mis ei mõjuta rakkude elumust (Arukuusk *et al.*, 2013). Antud töös läbi viidud rakkude elumuse määramise katse käitas, et histidiinirikkad RSP-d seotuna siRNA-ga kompleksis ei mõju rakkudele toksiliselt ega alanda nende elumust. Kõige toksilisemaks osutus töös kasutatud peptiididest 4 histidiiniga peptiid, mis näitas transfektsioonikatsetes sama head efektiivsust kui 6 histidiiniga peptiid. 6 histidiiniga RSP H6-C20 aga toksilist efekti ei täheldatud, mis teeb sellest edukama ja ohutuma transportvektori, mis sobiks ka kasutamiseks *in vivo*.

Võttes arvesse saadud tulemusi võib öelda, et püstitatud hüpotees kehtib - histidiinide arv peptiidahelas mõjutab RSP-de omadusi nagu keskkonna pH säilitamise võime, komplekside stabiilsus ning rakkudesse sisenemise efektiivsus. Kõige sobilikum siRNA transporteriks on 6 histidiini sisaldav RSP H6-C20, mis moodustab keskmise tugevusega komplekse, mis sobivad *in vitro* kasutamiseks. Need kompleksid ei vähenda rakkude elumust ning seega on ohutud kasutada ka *in vivo* tingimustes. Antud töö tõestab, et H6-C20 vahendatud siRNA transport rakkudesse võiks tulevikus potentsiaalselt rakendada ka erinevate geneetiliste haigusseisundite leevendamiseks.

## Kokkuvõte

Geeniteraapia üheks suurimaks väljakutseks on leida efektiivne ning ohutu transportvektor nukleiinhappemolekulide ja muude terapeutiliste ühendite viimiseks rakkudesse. Üheks edukaks kandidaadiks võivad olla RSP-d, mis suudavad rakku transportida nende külge seotud lastmolekule terapeutilise efekti saavutamise eesmärgil.

Antud töö eesmärgiks oli välja selgitada RSP NF55 histidiinidega pH-tundlike analoogide H4-C18, H6-C20, H6<sup>1</sup>-C18 ja H8-C20 hulgast parim, mida kasutada siRNA transportimiseks geenivaigistamise eesmärgiga.

Katsetulemustest järeldus, et histidiinide lisamine peptiidahelasse parandab RSP-de omadusi nagu keskkonna pH-säilitamise võime, kompleksi stabiilsus ja rakku sisenemise efektiivsus. Mida rohkem oli lisatud histiidine peptiidahelasse, seda paremini säilitas RSP keskkonna pH-d läbi puhverdamise. Sama kehtis ka komplekside stabiilsuse kohta - mida rohkem oli ahelas histiidne, seda tugevamalt moodustus kompleks siRNA ja RSP vahel. See omadus aga ei pruugi olla alati vajalik ja soovitatav rakukatsetes, kus liiga tugevasti seotud siRNA ei suuda vabaneda kompleksist ning seega ei avaldu ka soovitud bioloogiline efekt.

Antud bakalaureusetöös on välja selgitatud, et kasutatud histidiinirikastest RSP-dest on efektiivseim H6-C20, mis moodustab siRNA-ga hepariini soolade ja proteinaas K juuresolekul keskmise tugevusega kompleksi, mis pole ei liiga tugev ega liiga nõrk. siRNA/H6-C20 kompleks saavutab soovitud bioloogilise efekti transfektsioonil U87-luc2 või CHO-GFP rakkudesse, reguleerides maha sihtmärkgeeni. Samuti ei oma H6-C20 rakkude negatiivset efekti ei puhtal kujul peptiidilahusena ega ka seotuna kompleksis. Nende tulemuste põhjal võib väita, et H6-C20 vahendatud siRNA transporti võiks edaspidi kasutada ka *in vivo* tingimustes ning tulevikus ka potentsiaalselt geneetiliste vigade poolt põhjustatud haigusseisundite leevendamiseks.

## Histidine-rich cell-penetrating peptides for siRNA delivery

Kaisa Pöhäkö

### Summary

One of the biggest challenge in gene therapy is to find an effective and safe transporter for delivery of nucleic acids and other therapeutic compounds into the cells. One successful candidate may be CPPs that are capable to penetrate into cells and transport cargo molecules attached in order to achieve desired therapeutic effect.

The aim of this thesis was to find out which CPP NF55 analouge with histidine residues - H4-C18, H6-C20, H6<sup>1</sup>-C18 and H8-C20 - is the best candidate for siRNA delivery into the cells in order to perform gene silencing.

The experiment results showed that adding histidines into peptide chain improves properties such as the ability of maintaining the environmental pH, the stability of the complex and the cellular uptake efficiency. Same rule applied on siRNA/CPP complexes stability - the more histidines were in peptide chaine the stronger was formed complex between siRNA and CPP. This feature, however, may not always be necessary and desirable for *in vitro* or *in vivo* experiments, where too tightly formed complex is unable to release the siRNA, and thus does not induce the desired biological effect

In this thesis has been concluded that most effective candidate for siRNA delivery was CPP H6-C20, which forms optimal complex in the presence of heparin salts and enzyme proteinase K. siRNA/H6-C20 complex will achieve the desired biological effect - downregulation of the target gene - in cell-lines U87-luc2 and CHO-GFP. It also does not have any negative effect on the cell survival. Based on these results it can be stated that the H6-C20-mediated siRNA delivey into the cells could be used in *in vivo* experiments in future and potentially could also be used to alleviate genetic defects.

## Kasutatud kirjandus

1. Al-Dosari, M. S. & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS Journal*. 11: 671-681.
2. Andaloussi, S., Lehto, T., Lundin, P. & Langel, Ü. (2011). Application of PepFect Peptides for the Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 39: 3972–3987.
3. Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., Copolocivi, D.M., Margus, H., Padari, K., Möll, K., Maslovskaja, J., Tegova, R., Kivi, G., Tover, A., Pooga, M., Ustav, M., Langel, Ü. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828: 1365-1373.
4. Brasseur, R. & Divita, G. (2010). Happy birthday cell penetrating peptides: already 20 years. *Biochim Biophys Acta*. 1798: 2177-81.
5. Cerrato, C. P., Lehto, T., Langel, Ü. (2014). Peptide-based vectors: recent developments. *Biomolecular Concepts*. 5: 479-488.
6. Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., Liang, X. (2016). Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nature biotechnology*. 35: 230-237.
7. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 10444-10450.
8. Eguchi, A. & Dowdy, S. F. (2004). siRNA delivery using peptide transduction domains. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30:341-345.
9. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. & Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 664-668.
10. Finer, M. & Glorioso, J. (2017). A brief account of viral vectors and their promise for gene therapy. *Gene Therapy*. 24:1-2.
11. Fonseca, S. B., Pereira, M. P., Kelley, S. O. (2009). Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 953–964.
12. Frankel, A. D. & Pabo C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 55: 1189-1193.
13. Freimann, K., Arukuusk, P., Kurrikoff, K., Vasconcelos, L. D. F., Veiman, K.-L., Uusna, J., Margus, H., Carcia-Sosa, A. T., Pooga, M., Langel, Ü. (2016). Optimization



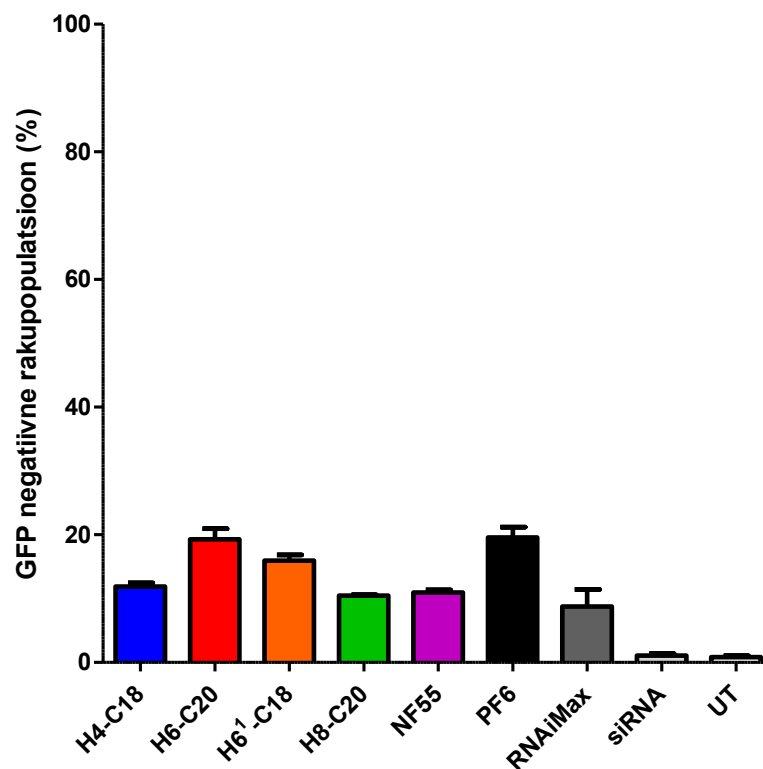
- of in vivo DNA delivery with NickFect peptide vectors. *Journal of Controlled Release*. 241: 135–143.
14. Gao, X., Kim, K.-S. & Lui, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS journal*. 9: 92-104.
  15. Green, M. & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat< I> Trans</I>-Activator Protein. *Cell*. 55: 1179-1188.
  16. Gupta B., Levchenko, T. S. & Torchilin, V. P. (2005). Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptide. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 637-651.
  17. Hardee, C. L., Ar évalo-Soliz, L. M., Hornstein, B. D., Zechiedrich, L. (2017). Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes*. 8: 1-22.
  18. Heitz, F., Morris, M. C. & Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutic. *British Journal of Pharmacology*. 157: 195–206.
  19. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 1864-1868.
  20. Kacprzyk, L., Rydengard, V., Mörgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M., Schmidtchen, A. (2007). Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768: 2667–2680.
  21. Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., Baba, Y. (2013). Acidic extracellularmikroenvironment and cancer. *Cancer Cell International*. 13: 89-97.
  22. Kichler, A., Mason, A. J., Bechinger, B. (2006). Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758: 301–307.
  23. Koren, E. & Torchilin, V. P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends in Molecular Medicine*. 18: 385-393.
  24. Langel, Ü. (2015). *Cell-penetrating peptides: Methods and Protocols*, p.3-21. 2nd ed., Humana Press, New York.
  25. Lehto, T., Simonson, O.E., Mäger, I., Ezzat, K., Sork, H., Copolovici, D-M., Viola, J.R., Zaghloul, E.M., Lundin, P., Moreno, P.M.D., Mäe, M., Oskolkov, N., Suhorutšenko, J., Smith, C.E., El-Andaloussi, S. (2011). A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer In Vitro and In Vivo. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. 8: 1457–1467.

26. Lehto, T., Vasconcelos, L., Margus, H., Figueroa, R., Pooga, M., Hällbrink, M., Langel, Ü. (2017). Saturated Fatty Acid Analogues of Cell-Penetrating Peptide PepFect14: Role of Fatty Acid Modification in Complexation and Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry*. 28: 782–792.
27. Liao, S.-M., Du, Q.-S., Meng, J.-Z., Pang, Z.-W., Huang, R.-B. (2013). The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chemistry Central Journal*. 7: 44-56.
28. Lo, S. L. & Wang, S. (2008). An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials*. 29: 2408-2414.
29. Melikov, K. & Chernomordi, L. K. (2005). Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62: 2739–274.
30. Moulay, G., Leborgne, C., Mason, A. J., Aisenbrey, C., Kichlera, A., Bechinger, B. (2016). Histidine-rich designer peptides of the LAH4 family promote cell delivery of a multitude of cargo. *Journal of Peptide Science*. 4: 320-328.
31. Mäe, M., Andaloussi, S. E., Lehto, T. & Langel, Ü. (2009). Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 6: 1195-1205.
32. Nayerossadat, N., Maedeh, T., Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*. 1: 1-46.
33. Pae, J. & Pooga & M., (2014). Peptide-mediated delivery: an overview of pathways for efficient internalization. *Therapeutic Delivery*. 5:1203-1222.
34. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. (1998). Cell penetration by transportan. *The FASEB journal*. 12: 67-77.
35. Prasad, S. C. & Roy, I. (2008). Nucleic acid based therapeutic molecules. *Current Research & Information on Pharmaceutical Sciences*. 9: 49-55
36. Regber, J., Vasconcelos, L., Madani, F., Langel, Ü., Hällbrink, M. (2016). pH-responsive PepFect cell-penetrating peptides. *International Journal of Pharmaceutics*. 501: 32-38.
37. Ross, N. T. & Wilson, C. J. (2014). In vitro clinical trials: the future of cell-based profiling. *Frontiers in Pharmacology*. 5:1-6.
38. Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. & Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1467: 165-176.

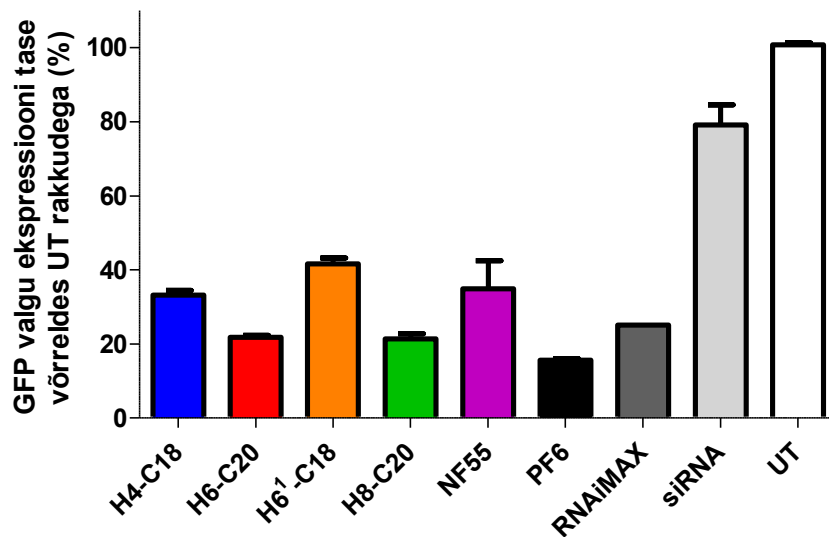
39. Stewart, K. M., Hortonb, K. L., Kelley, S. O. (2008). Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 6: 2242–2255.
40. Swiecicki, J.-M., Pisa, M. D., Chwetzoff, S., Mansuy, C., Trugnan, G., Chassaing, G., Lavielle, S., Burlina, F. (2015). Unsaturated acyl chains dramatically enhanced cellular uptake by direct translocation of a minimalist oligo-arginine lipopeptide. *Chemical Communication*. 51: 14656-14659.
41. Wilson, R. C. & Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics*. 42: 217–239
42. Viola, J. R., El-Andaloussi, S., Oprea, I. I., Smith, C. E. (2010). Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert opinion on drug delivery*. 7: 721-735.

## Lisad

**Lisa 1.** CHO-GFP-negatiivsete rakkude populatsioon võrrelduna CHO-GFP-positiivsete rakkude populatsiooniga. Mõõdetud läbivoolutsütomeetriaga pärast 24 tundi transfekteerimist. siGFP lõppkontsentratsioon oli 25 nM.



**Lisa 2.** Transfektisooni efektiivsuse ja bioloogilise efekti määramine CHO-GFP rakkudes siGFP/RSP kompleksidega pärast 48 tundi transfekteeerimist. siGFP lõppkontsentratsioon oli 100 nM.



## **Lihtlitsents**

Mina, Kaisa Põhako,

(sünnikuupäev 15.01.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Histidiinirikad rakkudesse sisenevad peptiidid siRNA transpordiks“, mille juhendaja on Piret Arukuusk, *PhD*,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017

## **Tänuavaldused**

Täna südamest oma juhendajat Piret Arukuuske suurepärase juhendamise, edasiviiva kriitika ja heade nõuannete eest. Lisaks lähevad tänusõnad Ly Pärnastele ääretu abivalmiduse ja vastutulelikkuse eest. Samuti tänan professor Ülo Langelit ning meeldivaid laborikaaslasi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laborist.